



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94899 (13) C2

(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФІКСОВАНЕ ДОЗУВАННЯ АНТИТІЛ ДО HER

1

2

(21) a200709470

(22) 15.06.2005

(24) 25.06.2011

(86) PCT/US2005/021287, 15.06.2005

(31) 60/645,697

(32) 21.01.2005

(33) US

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) АЛЛІСОН ДЕВІД Е., US, БРЮНО ПЕНЕ, FR,
ЛУ ЦЗЯНЬ-ФЕН, CN/US, НГ ЧІ М., US

(73) ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., US

(56) WO0100238 A1, 04.01.2001.

MALIK M. A. ET AL: "Dose-response studies of recombinant humanized monoclonal antibody 2C4 in tumor xenograft models." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 44, July 2003 (2003-07), page 150, XP001246708 & 94TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; JULY 11-14, 2003.

BASELGA J ET AL: "PHASE II STUDY OF WEEKLY INTRAVENOUS RECOMBINANT HUMANIZED ANTI-P185HER2 MONOCLONAL ANTIBODY IN PATIENTS WITH HER2/NEU-OVEREXPRESSING METASTATIC BREAST CANCER" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, GRUNE AND STRATTON, NEW YORK, NY, US, vol. 14, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 737-744.

BASELGA J: "Phase I and II clinical trials of trastuzumab" ANNALS OF ONCOLOGY 2001 NETHERLANDS, vol. 12, no. SUPPL. 1, 2001, pages S49-S55.

AGUS D B ET AL: "PHASE I CLINICAL STUDY OF PERTUZUMAB, A NOVEL HER DIMERIZATION INHIBITOR, IN PATIENTS WITH ADVANCED CANCER" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, GRUNE AND STRATTON, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 11, 10 April 2005 (2005-04-10), pages 2534-2543.

NG C ET AL: "Rationale for fixed dosing of pertuzumab by population pharmacokinetic (POP PK) modeling" CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS, MOSBY-YEAR BOOK, ST LOUIS, MO, US, vol. 77, no. 2, 5 February 2005 (2005-02-05), page P33.

BASELGA J ET AL: "RECEPTOR BLOCKADE WITH MONOCLONAL ANTIBODIES AS ANTI-CANCER THERAPY" PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 64, no. 1, 1994, pages 127-154.

LEYLAND-JONES BRIAN: "Dose scheduling-Herceptin(R)" ONCOLOGY (BASEL), vol. 61, no. Suppl 2, October 2001 (2001-10), pages 31-36.

FRANKLIN MATTHEW C ET AL: "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex" CANCER CELL, vol. 5, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 317-328.

(57) 1. Спосіб лікування раку, що включає введення однієї або більше доз антитіла до HER2 хворій людині у кількості, ефективній для лікування раку, в якому антитіло до HER2 зв'язується з доменом II зовнішньоклітинного домену HER2.

2. Спосіб за п. 1, в якому антитіло зв'язується зі сполученням між доменом I, II та III зовнішньоклітинного домену HER2.

3. Спосіб за п. 1 або п. 2, в якому HER2 антитіло пригнічує гетеродимеризацію HER2 з EGFR або HER3.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому HER2 антитіло складається з послідовностей різних легких та різних важких амінокислот у SEQ ID N: 3 та 4, відповідно.

5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому антитіло до HER2 є пертузумабом.

6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому фіксована доза знаходиться в діапазоні від приблизно 20 мг до приблизно 2000 мг антитіла до HER2.

7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому фіксована доза вибирається з групи, що складається з приблизно 420 мг, приблизно 525 мг, приблизно 840 мг та приблизно 1050 мг HER2 антитіла.

8. Спосіб за п. 7, в якому фіксована доза складає приблизно 420 мг антитіла до HER2.

9. Спосіб за п. 7, в якому фіксована доза складає приблизно 1050 мг антитіла до HER2.

10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому фіксовану дозу антитіла до HER2 вводять хворому приблизно кожного тижня, приблизно кожні 2 тижні, приблизно кожні 3 тижні або приблизно кожні 4 тижні.

(13) C2

(11) 94899

(19) UA

11. Спосіб за п. 10, в якому фіксована доза антитіла до HER2 уводиться хворому приблизно кожні 3 тижні.
12. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому антитіло до HER2 є ізольованим антитілом.
13. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому антитіло до HER2 є інтактним антитілом.
14. Спосіб за будь-яким з пунктів від 1 до 12, в якому антитіло до HER2 є фрагментом антитіла, до якого входить ділянка, що зв'язує антиген.
15. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому антитіло до HER2 є адаптованим до людини або IgG1 антитілом людини.
16. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, в якому рак проявляє HER експресію, апмліфікацію або активацію.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, в якому рак є раком яєчників, перитонеальним раком або раком фаллопієвої труби.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, в якому рак є метастатичним раком молочної залози (MBC).
19. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-16, в якому рак є недрібноклітинною карциномою легень (NSCLC).
20. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-16, в якому рак є раком простати.
21. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-16, в якому рак є раком кишечника.
22. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, що включає введення хворому другого терапевтичного агента.
23. Спосіб за п. 22, в якому другий терапевтичний агент вибирають з групи, що складається з хіміотерапевтичного засобу, іншого HER антитіла, антитіла, спрямованого проти антигену, асоційованого з іншою пухлиною, антигормональної сполуки, кардіопротектора, сайтокіна, препарату, спрямованого на EGFR, антиангіогенного засобу, інгібітору тирозинкінази, інгібітору COX, нестероїдного протизапального препарату, інгібітору фарнезилтрансферази, антитіла, що зв'язує онкоембріональний білок CA 125, вакцини HER2, іншої, спрямованої на HER терапії, Raf або ras інгібітору, доксорубікону HCL ліпосомної ін'єкції, топотекану, таксану, інгібітору дуальної тирозинкінази, TLK286, EMD-7200, препарату проти нудоти, препарату, що запобігає або лікує шкірне висипання, або стандартної акнетерапії, препарату, що знижує температуру тіла, та фактора кровотворного росту.
24. Спосіб за п. 23, в якому другий терапевтичний засіб є хіміотерапевтичним засобом.
25. Спосіб за п. 24, в якому хіміотерапевтичний засіб є антиметаболітним хіміотерапевтичним засобом.

26. Спосіб за п. 25, в якому антиметаболітний хіміотерапевтичний засіб є гемцитабіном.
27. Спосіб за п. 23, в якому другий терапевтичний засіб є трастузумабом, ерлотинібом HCL або бевацизумабом.
28. Спосіб лікування раку у хворій людині, що передбачає введення принаймні одної фіксованої дози пертузумабу хворому, причому фіксована доза вибирається з групи, що складається з приблизно 420 мг, приблизно 525 мг, приблизно 849 мг та приблизно 1050 мг пертузумабу.
29. Спосіб за п. 28, в якому фіксована доза пертузумабу уводиться хворому приблизно кожні 3 тижні.
30. Спосіб за п. 28 або за п. 29, в якому рак вибирають з групи, що складається з раку яєчника, перитонеального раку, раку фаллопієвої труби, метастатичного раку молочної залози (MBC), недрібноклітинної карциноми легень (NSCLC), раку простати та раку кишечника.
31. Виріб, що складається з ампули, що містить фіксовану дозу HER2 антитіла, в якому фіксована доза вибирається з групи, що складається з приблизно 420 мг, приблизно 525 мг, приблизно 840 мг та приблизно 1050 мг HER2 антитіла, в якому HER2 антитіло є пертузумабу.
32. Виріб за п. 31, що також містить листівку-вкладиш, що інструктує користувача стосовно введення фіксованої дози хворому на рак.
33. Виріб за п. 32, в якому рак вибирається з групи, що складається з раку яєчника, перитонеального раку, раку фаллопієвої труби, метастатичного раку молочної залози (MBC), недрібноклітинної карциноми легень (NSCLC), раку простати, раку кишечника.
34. Виріб за п. 32 або п. 33, в якому листівка-вкладиш також інструктує користувача стосовно введення фіксованої дози хворому на рак, у якого рак проявляє HER експресію, апмліфікацію або активацію.
35. Виріб за будь-яким з пунктів від 31 до 34, до складу якого входять дві ампули, у якому перша ампула містить фіксовану дозу приблизно 849 мг пертузумабу, а друга ампула містить фіксовану дозу приблизно 420 мг пертузумабу.
36. Виріб за будь-яким з пунктів від 31 до 34, до складу якого входять дві ампули, в якому перша ампула містить фіксовану дозу приблизно 1050 мг пертузумабу, а друга ампула містить фіксовану дозу приблизно 525 мг пертузумабу.

Це є непередня заявка, подана відповідно до 37 CFR 1.53(b), що заявляє про переваги відповідно до 35 USC § 119(e) попередньої заявки 60/645,697, що була подана 21 січня 2005 р., зміст якої включено до цього документу шляхом посилання.

Даний винахід стосується фіксованого дозування антитіл до HER, таких як Пертузумаб.

HER-рецептори та антитіла до них

Родина HER рецептору тирозинкінази є важливим медіатором росту, диференціювання та довголіття клітин. Ця родина рецептору складається з чотирьох окремих членів, включаючи ре-

цептори до епідермального фактору росту (EGFR, ErbB1, або HER1)), HER2 (ErbB2 або p185^{neu}), HER3 (ErbB3) та HER4 (ErbB4 або tyro2).

EGFR, що кодується геном erbB1 є причиною злоякісних новоутворень у людини. Зокрема, зростання експресії EGFR спостерігається при раці грудей, сечового міхура, легень, голови, шиї та шлунка так само, як при гліобlastомах. Зростання експресії EGFR-рецепторів часто асоціюється зі зростанням продукції EGFR-ліганд, що трансформують фактор росту альфа (TGF- α) через активацію рецепторів деяких пухлинних клітин шляхом аутокринної стимуляції. Baselga and Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994). Моноклональні антитіла, що спрямовані проти EGFR або їх ліганд, TGF- α та EGF, були оцінені як терапевтичні агенти при лікуванні таких злоякісних новоутворень. Дивись, наприклад, вказані вище Baselga and Mendelsohn, Masui et al. *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); and Wu et al. *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995).

Другий член родини HER-рецепторів p185^{neu} був спершу ідентифікований як продукт трансформації гену через нейробластому у щурів після хіміотерапії. Активована форма неї протоонкогену виникає через точкову мутацію (заміна валіну на глутаматну кислоту) в трансмембранній області кодованого протеїну. Ампліфікація людського гомологу неї спостерігається при пухлинах грудей та яєчників та корелює з поганим прогнозом (Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); та US Pat No. 4,968,603). На даний час немає даних щодо таких точкових мутацій, як при неї протоонкогені для пухлин у людей. Надекспресія HER2 (часто, але не постійно через ампліфікації гену) також спостерігається при інших карциномах, включаючи карциному шлунку, ендометрію, слинних залоз, легень, нирок, товстого кишечника, щитоподібної залози, підшлункової залози, сечового міхура. Дивись серед іншого, King et al., *Science*, 229:91 A (1985); Yokota et al., *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushima et al., *Mol Cell Biol.* 6:955-958 (1986); Guerine 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); та McCann et al., *Cancer*, 65:88-92 (1990). Надекспресія HER2 може спостерігатися при раці простати (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); та Sadasivan et al., *J. Urol* 150:126-31 (1993)).

Були описані антитіла, що спрямовані проти щурячого p185^{neu} та людського HER2 білкових продуктів. Drebin та колеги створили антитіла проти щурячого неї генного продукту p185^{neu}. Дивись, наприклад, доповідь Derebin et al., *Cell* 41:695-706(1985); Myers et al., *Meth. Enzym.* 198:277-290(1991); та WO94/22478. Drebin et al. *Oncogene*

2:273-277 (1988), відповідно до якої суміші реактиву антитіл з двома окремими ділянками p185^{neu} дає синергічний протипухлинний ефект на неї трансформованих NIH-3T3 клітинах, імплантованих до "голої" миші. Дивись також U.S. Patent 5,824,311, виданий 20 жовтня 1998 р.

Hudziak et al., *Mol Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) описують покоління ряду антитіл до HER2, які були охарактеризовані за допомогою клітин пухлини грудей лінії SK-BR-3. Проліферація клітин, споріднених до SK-BR-3 клітин, внаслідок впливу антитіл була визначена за допомогою фарбування кристалвіолетом моношарів після 72 годин. Використовуючи цей дослід, максимальне пригнічення було отримане з так званим антитілом 4D5, яке інгібує клітинну проліферацію на 56%. Інші антитіла ряду знизили клітинну проліферацію в цьому досліді в меншій мірі. Антитіло 4D5 також підвищує чутливість HER2-надекспресованого ряду клітин пухлини грудей до цитотоксичних ефектів TNF- α . Дивись також U.S. Patent No. 5,677,171, виданий 14 жовтня 1997 р. Антитіла до HER2, що розглядаються в Hudziak et al. Пізніше характеризуються в Fendly et al. *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts et al. *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarap 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); та Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394(1997).

Рекомбінантна людська версія мишачого антитіла до HER2 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Трастузумаб або ГЕРЦЕПТИН⁷; U.S. Patent No. 5,821,337) клінічно активна у пацієнтів з HER2-надекспресованими метастатичними раками грудей, які попередньо отримували масовану протипухлинну терапію (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:131-144 (1996)). Трастузумаб отримав дозвіл від Адміністрації з контролю за продуктами харчування та ліками 25 вересня 1998р. для лікування пацієнтів з метастатичним раком грудей, чий пухлини надекспресують HER2-протеїн.

Інші антитіла до HER2 з різноманітними якостями були описані в 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); U.S. Patent No. 5,783,186 та Klappereia/. *Oncogene* 14:2099-2109(1997).

Гомологічний скринінг дав результат в ідентифікації двох інших членів родини HER-рецепторів; HER3 (US Pat. Nos. 5,183,884 та 5,480,968, а також Kraus et al., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)) та HER4 (EP Pat Appln No 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); та Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)). Обидва ці рецептори показують зростання експресії принаймні деяких рядів клітин раку грудей.

HER-рецептори зазвичай знаходять в клітинах в різних комбінаціях та вважається, що гетеродимеризація збільшує різноманітність клітинної відповіді до багатоманітності HER-ліганд (Earp et al. Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995)). EGFR пов'язаний з шістьма різними лігандами: епідермальним фактором росту (EGF), трансформуючим фактором росту альфа (TGF- α), амфірегуліном, гепаринзв'язуючим епідермальним фактором росту (HB-EGF), бетацелюліном та епірегуліном (Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994)). Родина протеїнів херегулінів - результат альтернативного сплайсінгу одинарного гену лігандами HER3 та HER4. Родина херегулінів включає в себе альфа-, бета- та гамма-херегуліни (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); U.S. Patent No. 5,641,869; та Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)); фактори неї диференціації (NDFs), гліальні фактори росту (GGFs); ацетилхоліновий рецептор, що індукє активність (ARIA); та фактор розгалуження чутливого і моторного нейронів (SMDF). Дивись Groenen et al. Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996) та Lee et al. Pharm. Rev. 47:51-85 (1995). Нещодавно були ідентифіковані три додаткові HER-ліганди; неурегулін-2 (NRG-2), який згідно доповідей, зв'язує будь-який HER3 або HER4 (Chang et al. Nature 387:509-512 (1997); та Carraway et al. Nature 387:512-516 (1997)); неурегулін-3, який зв'язує HER4 (Zhang et al. PNAS (USA) 94(18):9562-7 (1997)); та неурегулін-4, який зв'язує HER4 (Harari et al. Oncogene 18:2681-89(1999)) HB-EGF, бетацелюлін та епірегулін також зв'язують HER4.

Хоча EGF та TGF α не зв'язують HER2, EGF стимулює EGFR та HER2 до формування гетеродимеру, який активує EGFR та призводить до трансфосфорилляції HER2 у гетеродимер. Димеризація та/або трансфосфорилляція з'являються для активації HER2 тирозинкінази. Дивись Earp et al., вище. Так само, коли HER3 коекспресує з HER2, формується активний сигнальний комплекс та антитіла, спрямовані проти HER2, які можуть зруйнувати цей комплекс (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20): 14661-14665 (1994)). До того ж, спорідненість HER3 до херегуліну (HRG) зростає при коекспресії з HER2. Дивись також Levi et al., Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995) та Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465 (1996) щодо HER2-HER3 білкового комплексу. HER4, подібно до HER3, формує активний сигнальний комплекс з HER2 (Carraway та Cantley, Cell 78:5-8 (1994)).

Патентні публікації щодо антитіл до HER включають: US 5,677,171, US 5,720,937, US 5,720,954, US 5,725,856, US 5,770,195, US

5,772,997, US 6,165,464, US 6,387,371, US 6,399,063, US2002/019221 1A1, US 6,015,567, US 6,333,169, US 4,968,603, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213, US 6,719,971, US 6,800,738, US2004/0236078A1, US 5,648,237, US 6,267,958, US 6,685,940, US 6,821,515, WO98/17797, US 6,127,526, US 6,333,398, US 6,797,814, US 6,339,142, US 6,417,335, US 6,489,447, WO 99/31140, US 2003/0147884A1, US 2003/0170234A1, US 2005/0002928A1, US 6,573,043, US 2003/0152987A1, WO 99/48527, US 2002/0141993A1, WO 01/00245, US 2003/0086924, US 2004/0013667A1, WO 00/69460, WO 01/00238, WO 01/15730, US 6,627,196B1, US 6,632,979B1, WO 01/00244, US 2002/0090662A1, WO 01/89566, US 2002/0064785, US 2003/0134344, WO 04/24866, US 2004/0082047, US 2003/0175845A1, WO 03/087131, US 2003/0228663, WO 2004/008099A2, US 2004/0106161, WO 2004/048525, US 2004/0258685A1, US 5,985,553, US 5,747,261, US 4,935,341, US 5,401,638, US 5,604,107, WO 87/07646, WO 89/10412, WO 91/05264, EP 412,116 B1, EP 494,135 B1, US 5,824,311, EP 444,181 B1, EP 1,006,194 A2, US 2002/0155527A1, WO 91/02062, US 5,571,894, US 5,939,531, EP 502,812 B1, WO 93/03741, EP 554,441 B1, EP 656,367 A1, US 5,288,477, US 5,514,554, US 5,587,458, WO 93/12220, WO 93/16185, US 5,877,305, WO 93/21319, WO 93/21232, US 5,856,089, WO 94/22478, US 5,910,486, US 6,028,059, WO 96/07321, US 5,804,396, US 5,846,749, EP 711,565, WO 96/16673, US 5,783,404, US 5,977,322, US 6,512,097, WO 97/00271, US 6,270,765, US 6,395,272, US 5,837,243, WO 96/40789, US 5,783,186, US 6,458,356, WO 97/20858, WO 97/38731, US 6,214,388, US 5,925,519, WO 98/02463, US 5,922,845, WO 98/18489, WO 98/33914, US 5,994,071, WO 98/45479, US 6,358,682 B1, US 2003/0059790, WO 99/55367, WO 01/20033, US 2002/0076695 A1, WO 00/78347, WO 01/09187, WO 01/21192, WO 01/32155, WO 01/53354, WO 01/56604, WO 01/76630, WO02/05791, WO 02/11677, US 6,582,919, US2002/0192652A1, US 2003/0211530A1, WO 02/44413, US 2002/0142328, US 6,602,670 B2, WO 02/45653, WO 02/055106, US 2003/0152572, US 2003/0165840, WO 02/087619, WO 03/006509, WO03/012072, WO 03/028638, US 2003/0068318, WO 03/041736, EP 1,357,132, US 2003/0202973, US 2004/0138160, US 5,705,157, US 6,123,939, EP 616,812 B1, US 2003/0103973, US 2003/0108545, US 6,403,630 B1, WO 00/61145, WO 00/61185, US 6,333,348 B1, WO 01/05425, WO 01/64246, US 2003/0022918, US 2002/0051785 A1, US 6,767,541, WO 01/76586, US 2003/0144252, WO 01/87336, US 2002/0031515 A1, WO 01/87334, WO 02/05791, WO 02/09754, US 2003/0157097, US 2002/0076408, WO 02/055106, WO 02/070008, WO 02/089842 та WO 03/86467.

Діагностика

Пацієнти, до яких застосовувалося антитіло до HER2 трастузумаб, були відібрані для лікування на основі HEK2-надекспресії/ампліфікації. Дивись, наприклад, WO99/31140 (Paton et al.), US2003/0170234A1 (Hellmann, S.), та

US2003/0147884 (Paton et al.) та WO 01/89566, US 2002/0064785, та US 2003/0134344 (Mass et al.). Дивись також US 2003/0152987, Cohen et al., щодо використання імуногістохімічної (IHC) та флуоресцентної гібридизації in situ (FISH) для визначення HER2-надекспресії та ампліфікації.

WO 2004/053497 (Bacus et al.) стосується визначення або передбачення відповіді на терапію ГЕРЦЕПТИН⁷. US2004/013297A1 (Bacus et al.) стосується визначення або передбачення відповіді на терапію ABX0303 EGFR-антитілами. WO2004/000094 (Bacus et al.) - щодо визначення відповіді до GW572016, маленької молекули, EGFR-HER2-інгібітора тирозинкінази. WO2004/063709, Amler et al., стосується біомаркерів та способів визначення чутливості до інгібітора EGFR, еротиніба HCl. US 2004/0209290, Cobleigh et al., - щодо маркерів генної експресії для визначення прогнозу раку груди.

Пацієнти, що лікуються Пертузумабом можуть бути відібрані для терапії на основі HER-активації або димеризації. Патентні публікації щодо Пертузумабу та відбору пацієнтів для лікування ним включають: WO 01/00245 (Adams et al.); US 2003/0086924 (Sliwkowski, M.); US 2004/0013667A1 (Sliwkowski, M.), WO 2004/008099A2 та і US 2004/0106161 (Bossenmaier et al.).

Cronin et al., Am. J. Path. 164(1): 35-42 (2004) описують вимірювання генної експресії архівних парафінованих тканин. Ma et al. Cancer Cell 5:607-616 (2004) описує профілювання гену в олігонуклеотидній послідовності, за допомогою ізольованої РНК з секцій пухлинної тканини, які бралися з архівних первинних біопсій.

Дозування протипухлинних ліків та антитіл до HER

Статті, що описують дозування протипухлинних препаратів, включають: 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) та de Jong et al. Clin Cancer Res 10:4068-71 (2004).

Зазвичай доза доступних для придбання людських моноклональних антитіл IgG (Трастузумаб та Бевацізумаб, Genentech Inc., South San Francisco, та Гемтузумабу Озогомідин, Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia), та цитотоксичних дрібномолекулярних ліків в онкології визначається у розрахунку на одиницю ваги пацієнта (мг/кг) або одиницю площі поверхні його тіла (ППТ).

Цетуксімаб (ERBITUX®) - це антитіло, що зв'язує EGF рецептор та є випробуваним для лікування колоректального раку. При колоректальному раці Цетуксімаб призначається у дозі 400 мг/м² внутрішньовенно крапельно протягом двох годин у вигляді ударної дози. Після цього підтримуюча доза 250 мг/м² вводиться протягом 1 години один раз на тиждень. Дивись інструкцію до Цетуксімабу.

Трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®) призначається пацієнтам з метастатичним раком груди: 4мг/кг - ударна доза, з наступними - 2мг/кг на тиждень. Дивись інструкцію до Трастузумабу.

Дивись також WO 99/31140; US 2003/0147884A1; US 2003/0170234A1; US 2005/0002928A1; WO 00/69460; WO 01/15730 та US 6,627,196B1 щодо дозування Трастузумабу.

Пертузумаб (також відомий як рекомбінантні людські моноклональні антитіла 2C4; OMNITARG™, Genentech, Inc, South San Francisco) є першим в новому класі агентів, відомих як інгібітори HER-димеризації (HDI), він інгібує можливість HER2 формувати активні димери з іншими HER-рецепторами (такими як EGFR/HER1, HER3 і HER4) та не залежить від рівня експресії HER2. Дивись, наприклад, 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) та Malik et al. Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003).

Блокування Пертузумабом формування HER2-HER3-гетеро димерів в пухлинних клітинах було продемонстроване в пригніченні критичної сигналізації клітин, що проявляється у зменшенні пухлинної проліферації та часу її виживання (Agus et al. Cancer Cell 2:127-37 (2002)).

Пертузумаб пройшов випробування як окремий агент в Іа фазі клінічного випробування у пацієнтів з поширеним раком та ІІ фазу у пацієнтів з раком яєчників, раком груди, легень та простати. У І фазі дослідження пацієнтам з невиліковними, місцевопоширеними, повторними або метастатичними солідними пухлинами, що прогресували протягом або після стандартної терапії вводили Пертузумаб внутрішньовенно кожні 3 тижні. В цілому Пертузумаб переноситься пацієнтами добре. Регресія пухлини, яку можна було прийняти за достовірну, була досягнута у 3 з 20 пацієнтів. У двох пацієнтів була підтверджена часткова відповідь. Стабілізація хвороби, що тривала понад 2,5 місяця спостерігалась у 6 з 21 пацієнтів (Agus et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:192 (2003)). У дозі 2.0-15 мг/кг, фармакокінетика Пертузумабу була лінійною з середнім кліренсом 2,69-3,74 мл/добу/кг та середнім кінцевим напіввиведенням протягом 15,3 - 27,6 днів. Антитіла до Пертузумабу не були виявлені (Allison et al. Pro Am Soc Clin Oncol 22:197 (2003)). У І фазі дослідження Пертузумаб дозувався у розрахунку на одиницю ваги тіла (мг/кг). ІІ фаза була розпочата, використовуючи фіксовану дозу.

Цей винахід забезпечує першу критичну оцінку впливу і ефективності фіксованого дозування гуманізованого моноклонального антитіла IgG1 щодо фармакокінетики та цільової концентрації ліків. Первинними цілями аналізу антитіла до HER Пертузумабу були: 1) оцінити популяційну фармакокінетику та прогностичні випадкові перемінні для антитіла до HER Пертузумабу у пацієнтів, хворих на рак, та 2) вивчити варіабельність стаціонарних найнижчих концентрацій у сироватці після фіксованого, на одиницю ваги тіла або на одиницю площі поверхні тіла (ППТ) способів дозування.

Відповідно, з одного боку, винахід передбачає спосіб лікування хворих на рак, що включає призначення однієї або більше фіксованих доз антитіла

до HER людині-пацієнту у кількості, що є ефективною для лікування раку.

З іншого боку, винахід передбачає спосіб лікування пацієнтів, хворих на рак, що включає призначення принаймні однієї фіксованої дози Пертузумабу людині-пацієнту, де фіксована доза обирається в групі, що складається з приблизно 420мг, приблизно 525мг, приблизно 840мг та приблизно 1050мг Пертузумабу.

Винахід також стосується виробу, який включає ампулу з фіксованою дозою антитіла до HER, при чому фіксована доза обирається з групи, що складається з приблизно 420мг, приблизно 525мг, приблизно 840мг та приблизно 1050мг антитіла до HER.

Фігура 1 показує схематичну структуру HER2-протеїну та амінокислотну послідовність для Доменів I-IV (SEQ ID Nos. 19-22, відповідно) його екстрацелюлярного домену.

Фігури 2A та 2B зображують вирівнювання амінокислотних послідовностей легких варіабельних (V_L) (Фіг. 2A) та важких варіабельних (V_H) (Фіг. 2B) доменів мишачих моноклональних антитіл 2C4 (SEQ ID №№ 1 та 2, відповідно); V_L та V_H доменів людської 2C4 версії 574 (SEQ ID №№ 3 та 4, відповідно), та людські V_L та V_H узагальнюючі структури (hum k1, легка каппа підгрупа I; humIII, важка підгрупа III) (SEQ ID №№ 5 та 6, відповідно). Зірочкою позначено різницю між людською 2C4 версією 574 та мишачим моноклональним антитілом 2C4 або між гуманізованою 2C4 версією 574 і гуманізованою структурою. Області, що визначають комплементарність (CDRs) вказані у квадратних дужках.

Фігури 3A та 3B показують амінокислотну послідовність легкого та важкого ланцюгів Пертузумабу (SEQ ID №№ 13 та 14, відповідно). CDRs виділені жирним шрифтом. Підраховані молекулярні маси легкого та важкого ланцюгів становлять 23,526.22 Da та 49,216.56 Da (цистеїн у відновленій формі). Вуглеводна частина приєднана до важкого ланцюга Asn 299.

Фігура 4 схематично зображує приєднання 2C4 в сайті гетеродимерного з'єднання HER2, таким чином попереджуючи гетеродимеризацію з активованими EGFR або HER3.

Фігура 5 зображує зв'язок HER2/HER3 з сигнальними шляхами MAPK та Akt.

На Фігурі 6 порівнюються різні активності Трастузумабу та Пертузумабу.

Фігури 7A та 7B показують амінокислотну послідовність легкого ланцюга Трастузумабу (Фіг. 7A; SEQ ID No. 15) та важкого ланцюга (Фіг. 7B; SEQ ID No. 16), відповідно.

Фігури 8A та 8B зображують варіант послідовності легкого ланцюга Пертузумабу (Фіг 8A; SEQ ID No. 17) та варіант послідовності важкого ланцюга Пертузумабу (Фіг 8B; SEQ ID No. 18) відповідно.

Фігури 9A та 9B відображують профілі окремого об'єкту ФК даних, що відповідають одно- (Фіг 9A) або дво- (Фіг 9B) компарментальним моделям. Відкриті кола вказують концентрацію, що спостерігається. Суцільна та пунктирна лінії вказують на прогнозовану популяційну та прогнозовану індивідуальну концентрації відповідно.

Фігури 10A та 10B представляють схеми моделей діагностики. Фігура 10A зображує криву прогнозованих концентрацій Пертузумабу. Суцільна лінія - лінія з'єднання. Фігура 10B зображує криву зважених залишків прогнозованих концентрацій Пертузумабу. Пунктирна лінія є LOESS-вирівнюванням даних.

Фігури 11A та 11B зображують довільний ефект (η) для кліренсу (CL) за вагою (WT) та об'ємом в центральному компартменті (V_c) за площею поверхні тіла (ППТ) для базової моделі (Фіг 11A) та кінцевої моделі (Фіг 11B).

Фігури 12A-F показують моделі оцінювання кінцевої популяційної фармакокінетики Пертузумабу, використовуючи наступну модель перевірки. Наступне прогнозоване розподілення та оцінка, для статистичного аналізу: Фіг. 12A - 2.5th, Фіг. 12B - 5th; Фіг. 12C - 50th, Фіг. 12D - 90th, Фіг. 12E - 95th, Фіг. 12F - 97.5th. Вертикальна лінія на кожній гістограмі представляє статистичну оцінку.

Фігура 13 ілюструє прогнозовану стаціонарну найнижчу концентрацію Пертузумабу (84-й день) після фіксованого, на одиницю ваги (WT) тіла або на одиницю площі поверхні тіла способів дозування для 1000 модельованих об'єктів з покращеними, в порівнянні з оригінальною фармакокінетикою (ФК), даними відповідно до кінцевої моделі.

Фігури 14A та 14B показують прогнозовану стаціонарну найнижчу концентрацію Пертузумабу (84-й день) після фіксованого, на одиницю ваги (WT) тіла або на одиницю площі поверхні тіла (ППТ) дозування для популяцій пацієнтів з $\leq 10^{\text{th}}$ (50.4 кг) (Фіг. 14A) або $\geq 90^{\text{th}}$ (88.5 кг) (Фіг. 14B) WT величиною.

Визначення

"Фіксована" або "однорідна" доза терапевтичного агента означає дозу, що призначається людині-пацієнту, незважаючи на його вагу (WT) або площу поверхні тіла (ППТ). Через це фіксована або однорідна доза вказується не в мг/кг або мг/м², а в абсолютній кількості терапевтичного агента.

"Ударна" доза, зазвичай, включає початкову дозу терапевтичного агента, яка призначається пацієнту, та наступну одну або більше підтримуючі дози. Взагалі, призначається одна ударна доза, але при цьому розглядається можливість багаторазового призначення ударної дози. Зазвичай величина призначеної ударної дози (доз) перевищує величину підтримуючої дози (доз) та/або ударна доза призначається більш часто, ніж підтримуюча для більш швидкого досягнення бажаної стаціонарної концентрації терапевтичного агента.

"Підтримуюча доза" означає в цьому документі призначення однієї або більше доз терапевтичного агента пацієнту протягом всього терміну лікування. Зазвичай підтримуючі дози призначаються у певні терапевтичні інтервали, наприклад, приблизно кожний тиждень, кожні два, три або чотири тижні.

"HER-рецептор" - білковий рецептор тирозинкінази, що належать до родини HER-рецепторів і включають EGFR-, HER2-, HER3- та HER4-рецептори. HER-рецептор загалом включає екстрацелюлярний домен, який може зв'язатися з HER-лігандом та/або димеризувати з молекулою іншого HER-рецептору; ліпофільним трансмемб-

ранним доменом; збереженим інтрацелюлярним тирозинкіназним доменом та кінцевим сигнальним карбоксильним доменом, приховуючи кілька тирозинових залишків, які можуть бути фосфорильовані. HER-рецептор може бути нативною послідовністю HER-рецептора або варіантом амінокислотної послідовності. Переважно HER-рецептор - нативна послідовність людського HER-рецептору.

Терміни "ErbB1" та "HER1", "рецептори до епідермального фактору росту" та "EGFR" є взаємозамінними і означають EGFR, як описано, наприклад, у Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), включаючи мутантні форми, які зустрічаються у природі (e.g., делеція мутантного EGFR як у Humphrey et al. *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). erbB1 передбачає генне кодування продукції EGFR-білка.

Вирази "ErbB2" та "HER2" використовується взаємозамінно та означають людський HER2-протем, описаний, наприклад, у Semba et al. *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) та Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986) (Номер доступу у Банку генів X03363). Термін "erbB1" передбачає генне кодування людського ErbB2 та "neu" передбачає генне кодування щурячого p185^{neu}. Переважно HER2 - це нативна послідовність людського HER2.

Екстрацелюлярний домен HER2 включає в себе чотири домени: "Domain I" (амінокислотні залишки приблизно з 1-195; SEQ ID NO:19), "Domain II" (амінокислотні залишки приблизно з 196-319; SEQ ID NO:20), "Domain III" (амінокислотні залишки приблизно з 320-488; SEQ ID NO:21), та "Domain IV" (амінокислотні залишки приблизно з 489-630; SEQ ID NO:22) (залишки нумеруються без сигнального пептиду). Дивись 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) та Plowman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:1746-1750 (1993), а також Фіг. 1.

"ErbB3" та "HER3" означають поліпептидні рецептори, як описано, наприклад, у US Pat. №№ 5,183,884 та 5,480,968, а також у Kraus et al. *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989).

Терміни "ErbB4" та "HER4" означають поліпептидні рецептори, як описано, наприклад, у EP Pat Appln No 599,274; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993) та Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993), включаючи ізоформи, наприклад, як розкрито у WO 99/19488, опублікованому 22 квітня 1999р.

Під "HER-лігандою" розуміється поліпептид, що зв'язується та/або активує HER-рецептор. HER-ліганда, що розглядається тут, - це нативна послідовність людської HER-ліганди, а саме епідермальний фактор росту (EGF) (Savage et al., *J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); трансформуючий фактор росту альфа (TGF- α) (Marquardt et al., *Science* 223:1079-1082 (1984)); амфірегулін, також відомий як шванома або кератиноцит-аутокринний фактор росту (Shoyab et al. *Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura et al. *Nature* 348:257-260 (1990); and Cook et al. *Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); бетацелюлін (Shing et al., *Science* 259:1604-1607 (1993); та Sasada et al. *Biochem.*

Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); гепарин-зв'язуючий фактор росту (HB-EGF) (Higashiyama et al., *Science* 251:936-939 (1991)); епірегулін (Toyoda et al., *J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); та Komurasaki et al. *Oncogene* 15:2841-2848 (1997)); херегулін (див. нижче); неурегулін-2 (NRG-2) (Carraway et al., *Nature* 387:512-516 (1997)); неурегулін-3 (NRG-3) (Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); неурегулін-4 (NRG-4) (Harari et al. *Oncogene* 18:2681-89 (1999)); та кріпто (CR-1) (Kaman et al. *J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). HER-ліганди, які зв'язують EGFR, включають EGF, TGF- α , амфірегулін, бетацелюлін, HB-EGF та епірегулін. HER-ліганди, які зв'язують HER3, включають херегуліни. HER-ліганди, що здатні зв'язувати HER4, включають бетацелюлін, епірегулін, HB-EGF, NRG-2, NRG-3, NRG-4 та херегулін.

Коли використовується термін "херегулін" (HRG), мається на увазі поліпептид, продукція якого кодується геном, як це описано у U.S. Patent No. 5,641,869 або Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993). Зразки херегулінів включають херегулін- α , херегулін- β 1, херегулін- β 2 та херегулін- β 3 (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); and U.S. Patent No. 5,641,869); neu фактор диференціювання (NDF) (Peles et al. *Cell* 69: 205-216 (1992)); рецептор, що індукує активність ацетилхоліну (ARIA) (Falls et al. *Cell* 72:801-815 (1993)); гліальний фактор росту (GGFs) (Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318 (1993)); фактор розгалуження чутливого і моторного нейронів (SMDf) (Ho et al. *J. Biol. Chem.* 270:14523-14532 (1995)); γ -херегулін (Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394(1997)).

"HER-димер" - це нековалентно асоційований димер, що включає в себе принаймні два HER-рецептори. Такі комплекси можуть формуватися, коли клітина, що експресує два або більше HER-рецептори, піддається впливу HER-ліганд та може виділятися методом імунопреципітації і аналізуватися за допомогою SDS-PAGE, як це описано, наприклад, у Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20): 14661-14665 (1994). Приклади таких HER-димерів включають EGFR-HER2, HER2-HER3 та HER3-HER4 гетеродимери. Крім того, HER-димер може включати в себе два або більше HER2-рецептори, комбіновані з різними HER-рецепторами, такими як HER3, HER4 або EGFR. Інші протеси, такі як субодиниця цитокінового рецептору (наприклад, gp130) можуть асоціюватися з димером.

"HER-інгібітор" - це агент, який впливає на активацію або функціонування HER. Приклади HER-інгібіторів включають антитіла до HER (наприклад, EGFR, HER2, HER3 або HER4 антитіла); ліки спрямовані на EGFR; дрібномолекулярні HER-антагоністи; HER-інгібітори тирозинкінази; HER2 та EGFR подвійні інгібітори тирозинкінази, такі як лапатініб/GW572016; антисенсові молекули (див., наприклад, WO 2004/87207); та/або агенти, які зв'язують або впливають на функцію наступних сигнальних молекул, таких як MAPK або Akt (див. Фіг. 5). Переважно, HER-інгібітор - це антитіло або дрібна молекула, яка зв'язується з HER-рецептором.

"Антитіло до HER" - це антитіло, яке зв'язується з HER-рецептором. Іноді антитіло до HER підтримує активацію або функціонування HER-рецептора. Антитіло до HER переважно зв'язується з HER2-рецептором. Антитіло до HER2, про яке йдеться в цьому документі, - це Пертузумаб. Інший приклад антитіла до HER2 - Трастузумаб. Приклади EGFR-антитіл включають Цетуксімаб та ABX0303.

"Активация HER" означає активацію або фосфорилляцію будь-якого з HER-рецепторів. Взагалі, активация HER проявляється у сигнальній трансдукції (наприклад, що спричиняється інтрацелюлярним кіназним доменом HER-рецептора, що сприяє фосфорилюванню тирозинових залишків у HER-рецепторі або субстратному поліпептиді). Активация HER може спричинитися зв'язуванням HER-ліганди з HER-димером, що включає в себе потрібний HER-рецептор. Зв'язування HER-ліганди з HER-димером може активувати кіназний домен одного або більше HER-рецепторів у димері і таким чином проявитися у фосфорилюванні тирозинових залишків в одному або більше HER-рецепторах та/або фосфорилюванні тирозинових залишків у додатковому субстратному поліпептиді (поліпептидах), такому як Akt або MAPK інтрацелюлярна кіназа. Див., наприклад, Фіг. 5.

"Фосфорилюванням" називається приєднання однієї або більше фосфатних груп до білка, такого як HER-рецептор або його субстрату.

Антитілом, яке "інгібує димеризацію HER", називається антитіло, яке інгібує або впливає на формування HER-димеру. Переважно таке антитіло зв'язується з HER2 в його гетеродимерному сайті. Антитіло, що найкраще інгібує димеризацію - це Пертузумаб або MAb 2C4. Зв'язування 2C4 з гетеродимерним сайтом з'єднання HER2 проілюстроване на Фіг. 4. Інші приклади антитіл, що інгібують димеризацію HER, включають в себе антитіла, які зв'язуються з EGFR і таким чином інгібують його димеризацію з одним або кількома іншими HER-рецепторами (наприклад, моноклональні антитіла EGFR 806, MAb 806, які зв'язуються з активованим або вивільненим EGFR; див. Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); антитіла, які зв'язуються з HER3 і таким чином інгібують димеризацію з одним або кількома HER-рецепторами, та антитіла, які зв'язуються з HER4 і таким чином інгібують його димеризацію з одним або кількома HER-рецепторами.

Антитіло, яке "інгібує димеризацію ефективніше за Трастузумаб", це антитіло, яке знижує або усуває HER-димери більш ефективно (наприклад, принаймні в два рази ефективніше), ніж Трастузумаб. Переважно таке антитіло інгібує димеризацію HER2 принаймні так само ефективно як антитіло, відібране з групи, що складається з мишачого моноклонального антитіла 2C4, Fab-фрагменту мишачого моноклонального антитіла 2C4, Пертузумабу і Fab-фрагменту Пертузумабу. Інгібування димеризації HER може оцінюватися за допомогою прямого вивчення HER-димерів або за оцінкою активації HER, або наступної сигналізації, що виникає внаслідок HER-димеризації, та/або за оцінкою зв'язувальних сайтів HER2-антитіло тощо.

Досліди для скринінгу антитіл зі здатністю інгібувати димеризацію HER більш ефективно, ніж Трастузумаб, описані в Agus et al. Cancer Cell 2:121-131 (2002) та WO 01/00245 (Adams et al.). Лише як приклад, можна дослідити інгібіцію димеризації HER, оцінивши, наприклад, інгібіцію формування HER-димеру (див., наприклад, Фіг. 1A-B of Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) та WO 01/00245); зменшення активації HER-ліганд клітин, які експресують HER-димери (наприклад, WO 01/00245 та Фіг. 2A-B of Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002)); блокування HER-лігандами зв'язування з клітинами, які експресують HER-димери (наприклад, WO01/00245, та Фіг. 2E of Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002)); пригнічення росту пухлинних клітин (наприклад, MCF7, MDA-MD-134, ZR-75-1, MD-MB-175, T-47D клітин), які експресують HER-димери у присутності (або відсутності) HER-ліганд (наприклад, WO 01/00245 та Figs. 3A-D of Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002)); інгібують наступне сигналізування (наприклад, пригнічення HRG-залежної AKT-фосфорилляції або інгібування HRG-або TGF α -залежної MAPK фосфорилляції) (див., наприклад, WO 01/00245, та Фіг. 2C-D of Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002)). Також антитільне пригнічення HER-димеризації можна оцінити, вивчаючи, наприклад, з'єднувальний сайт HER2-антитіла, через оцінювання такої структури або моделі, як кристалоїдна структура зв'язку між антитілом і HER2 (Див., наприклад, Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

"Гетеродимерний з'єднувальний сайт" на HER2 означає ділянку в екстрацелюлярному домені HER2, що поєднується або роз'єднується з екстрацелюлярним доменом EGFR, HER3 або HER4, формуючи тим самим димер. Ця ділянка знаходиться у Домені II у HER2. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004).

HER2-антитіла можуть "інгібувати HRG-залежну AKT фосфорилляцію" та/або пригнічувати "HRG- або TGF α -залежну MAPK фосфорилляцію" більш ефективно (наприклад, принаймні у два рази ефективніше), ніж Трастузумаб (див., наприклад, Agus et al. Cancer Cell 2: 127-137 (2002) та WO01/00245).

Антитіло до HER2 може "не пригнічувати ектодоменне ділення HER2" (Molina et al. Cancer Res. 61:4744-4749(2001)).

Антитіло до HER2, що "з'єднується з гетеродимерним з'єднувальним сайтом" на HER2, приєднується до залишків у домені II (та іноді також приєднується до залишків в інших екстрацелюлярних доменах HER2, таких як домені I та III), і може заважати, принаймні в певній мірі, формуванню HER2-EGFR, HER2-HER3, або HER2-HER4 гетеродимерів. Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004) характеризує кристалічну структуру HER2-Пертузумабу, що зберігається з RCSB Protein Data Bank (ID Code IS78), ілюструє зразкове антитіло, яке з'єднується з гетеродимерним з'єднувальним сайтом на HER2.

Антитіло, що "приєднується до домену II" HER2, приєднується до залишків у домені II та іноді залишків в іншому домені (доменах) HER2, таких як домені I та III. Переважно, антитіло, яке

приєднується до домену II, приєднується до з'єднання між доменами I, II та III HER2.

Поліпептид з "нативною послідовністю" - це поліпептид, який має таку саму амінокислотну послідовність, як і природний поліпептид (наприклад, HER-рецептор або HER-ліганда). Такі поліпептиди з нативною послідовністю можуть бути взяті з природи або можуть бути синтезовані чи вироблені шляхом рекомбінації. Тому поліпептид з нативною послідовністю може мати амінокислотну послідовність природного людського поліпептиду, мишачого поліпептиду або поліпептиду будь-якого виду ссавців.

Термін "антитіло" тут використовується у найширшому значенні та враховує інтактні моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), сформовані з принаймні з двох інтактних антитіл та антитільних фрагментів поки вони проявляють бажану біологічну активність.

Термін "моноклональні антитіла" використовується для позначення популяції гомогенних антитіл, тобто індивідуальних антитіл, що включають ідентичну популяцію та/або зв'язують той самий епітоп(и), окрім можливих варіантів, які можуть виникати під час продукції моноклонального антитіла, але такі варіанти в цілому зустрічаються у невеликій кількості. Таке моноклональне антитіло, зазвичай, включає антитіло з поліпептидною послідовністю, яка зв'язує ціль, при цьому ціль-зв'язуюча поліпептидна послідовність отримується через процес, що включає відбір однієї ціль-зв'язуючої послідовності з множини поліпептидних послідовностей. Наприклад, процес відбору може бути відбором унікального клону з множини клонів, такої як пул гібридних клонів, фагових клонів або клонів з рекомбінантною ДНК. Під цим розуміється, що відібрана ціль-зв'язуюча послідовність, може бути додатково змінена, наприклад, для того, щоб покращити спорідненість до цілі, для гуманізації ціль-зв'язуючої послідовності, для покращення її продукції в культурі клітин, зменшення імуногенності *in vivo*, для створення поліспецифічних антитіл тощо, при цьому антитіло, що включає в себе змінену ціль-зв'язуючу послідовність, також є моноклональним антитілом цього винаходу. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло з препарату моноклональних антитіл, спрямоване проти окремої детермінанти на антигені. Крім їхньої специфічності, препарати моноклональних антитіл мають перевагу перед іншими імуноглобулінами у їхній типоспецифічності. Ознака "моноклональний" вказує на те, що антитіло було отримане з гомогенної популяції антитіл, і не повинна тлумачитися як така, що вимагає виготовлення антитіла якимось специфічним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, що можуть використовуватися відповідно до даного винаходу, можуть бути вироблені за допомогою різноманітних технологій, включаючи, наприклад, метод гібридоми (наприклад, 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., в: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), рекомбінантні ДНК методики (див., наприклад, U.S. Patent No. 4,816,567), технології візуалізації бактеріофару (див., наприклад, 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):A013-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004) та Lee et al. *J. Immunol Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), та технології продукування людських і подібних до людських антитіл у тварин, що мають частини або цілі локуси або гени, що кодують послідовність людських імуноглобулінів (див., наприклад, 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); U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (всі GenPharm); U.S. Patent No. 5,545,807; WO 1997/17852; U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425 та 5,661,016; 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), та Lonberg і Huszar, *Intern. Rev. Immunol*, 13: 65-93 (1995).

Моноклональні антитіла, про які йдеться тут, включають "химерні" антитіла, у яких частина важких та/або легких ланцюгів ідентична чи гомологічна відповідній послідовності в антитілах, що походять від певного виду чи належать до певного класу або субкласу антитіл, в той час як решта ланцюга (ланцюгів) ідентична чи гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, що походять від іншого виду чи належать до певного класу або субкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, якщо вони виявляють бажану біологічну активність (U.S. Patent No. 4,816,567 та Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Зазначені химерні антитіла, включають "приматизовані" антитіла з варіабельними антиген-зв'язуючими послідовностями домену, що походять від нелюдини-примата (наприклад, давні мавпи, людиноподібні мавпи, тощо) та послідовності з постійними ділянками людини.

"Фрагменти антитіла" включають частину інтактного антитіла, що переважно має на собі ділянку для зв'язування антигену. Прикладами фрагментів антитіла є Fab, Fab', F(ab')² та Fv фрагменти; димерні фрагменти антитіл; лінійні антитіла; одинокі ланцюгові антитільні молекули та поліспецифічні антитіла, сформовані з фрагменту(-ів) антитіл.

"Інтактне антитіло" включає дві антиген-зв'язуючі ділянки та Fc-ділянку. Частіше за все, інтактне антитіло має одну або більше ефекторні функції.

В залежності від амінокислотної послідовності постійного домену їх важких ланцюгів, інтактні антитіла можуть бути віднесені до різних "класів". Існує п'ять основних класів інтактних антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG та IgM. Кілька з них можуть бути роз-

ділені на "субкласи" (ізотопи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA та IgA2. Важко-ланцюгові постійні домени, які відповідають різним класам антитіл, називаються α , δ , ϵ та μ , відповідно. Субодиничні структури та тривимірні конфігурації різних класів імуноглобулінів добре відомі.

"Ефекторні функції" антитіла означають біологічні функції, що властиві Fc-ділянці (нативна послідовність Fc-ділянки або амінокислотний варіант послідовності Fc-ділянки) антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіл є Clq-зв'язування; цитотоксичність, що залежить від комплекменту; зв'язування Fc-рецептора; антитіло-залежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; регулювання рецепторів на поверхні клітин (наприклад, B-клітинний рецептор; BCR) тощо.

"Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність" та "ADCC" означають клітинно-опосередковану реакцію, у якій неспецифічні цитотоксичні клітини, які експресують Fc-рецептори (FcRs) (наприклад, Натуральні Кілери (NK), нейтрофіли та макрофаги), розпізнають зв'язане з клітиною-мішенню антитіло і призводять до лізису клітини-мішені. Первинні клітини-посередники ADCC, NK-клітини, експресують тільки Fc γ RIII, тоді як моноцити експресують Fc γ RI, Fc γ RII та Fc γ RIII. FcR-експресія на гематопоетичних клітинах підсумована у Таблиці 3 на стор. 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для того, щоб оцінити ADCC-активність необхідної молекули, може бути проведене ADCC-дослідження *in vitro*, як це описано у US Patent No. 5,500,362 або 5,821,337. Придатні для такого дослідження ефекторні клітини включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) та натуральні кілери (NK). Замість цього або додатково, ADCC-активність необхідної молекули може оцінюватися *in vivo*, наприклад, на тваринних моделях, як це описано у Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Людські ефекторні клітини" - це лейкоцити, які експресують один або більше FcRs та виконують ефекторні функції. Переважно клітини експресують принаймні Fc γ RIII та виконують ADCC-ефекторну функцію. Прикладами людських лейкоцитів-медіаторів ADCC є моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) та натуральні кілери (NK), моноцити, цитотоксичні Т-клітини та нейтрофіли; клітинам PBMC та NK¹ віддається перевага. Ефекторні клітини можуть бути ізольованими від нативного джерела, наприклад, від крові або клітин PBMC як тут описано.

Термін "Fc-рецептор" або "FcR" використовується для опису рецептора, який зв'язується з Fc-ділянкою антитіла. Перевагу надають FcR з нативною людською послідовністю FcR. Крім того, FcR, якому надають перевагу, зв'язує IgG (гамма-рецептор) і включає в себе рецептори Fc γ RI-, Fc γ RII- та Fc μ MP-підкласів, включаючи алельні варіанти та альтернативно сплайсовані форми цих рецепторів. Fc μ MP-рецептори включають в себе Fc γ RIIA ("активуючий рецептор") та Fc γ RIIB ("інгібуючий рецептор"), які мають подібні амінокислотні послідовності, що мають принципову різницю у

цитоплазматичних доменах). Активуючий рецептор має імунорецептор, в і цитоплазматичному домені що базується на тирозиновій активації (ITIM) (дивись огляд M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs розглянуто в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); та de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Інші FcRs, включаючи ті, що будуть ідентифіковані у майбутньому, охоплюються терміном "FcR". Цей термін також включає неонатальний рецептор FcRn, який відповідає за перенос материнських IgGs до плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) та Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) і регулює гомеостаз імуноглобулінів.

"Комплемент-залежна цитотоксичність" або "CDC" передбачає здатність молекули до лізису мішені у присутності комплекменту. Шлях активації комплекменту і ініціюється зв'язуванням першого компоненту системи комплекменту (C1q) з молекулою (наприклад, антитілом) у комплексі з відповідним антитілом. Для оцінки активації комплекменту може проводитися CDC-дослідження, наприклад, як описано у Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

"Нативні антитіла" - це зазвичай гетеротетрамеричні глікопротеїни вагою приблизно 150,000 Da, які складаються з двох ідентичних легких (L) та двох ідентичних важких (H) ланцюгів. Кожний легкий ланцюг з'єднується з важким ковалентним дісульфідним зв'язком, а кількість дісульфідних містків варіює у важких ланцюгах різних ізотипів імуноглобулінів. Кожний важкий і легкий ланцюг має рівновіддалені внутрішньоланцюгові дісульфідні містки. Кожний важкий ланцюг має на одному кінці варіабельний домен (V_H), за яким слідує константні домени. Кожний легкий ланцюг має варіабельний домен на одному кінці (V_L) та константні домени на іншому кінці. Константний домен легкого ланцюга зорієнтований на перший константний домен важкого ланцюга, і варіабельний домен легкого ланцюга зорієнтований на варіабельний домен важкого ланцюга. Вважається, що відповідні амінокислотні залишки формують зв'язок між варіабельними доменами легкого і важкого ланцюгів.

Термін "варіабельний" означає факт, що певні частини варіабельних доменів між антитілами суттєво відрізняються послідовністю та використовуються у зв'язуванні та специфікації кожного визначеного антитіла до його визначеного антигену. Однак варіабельність представлена нерівномірно серед варіабельних доменів антитіл. Вона сконцентрована у трьох сегментах, що називаються гіперваріабельними ділянками і знаходяться у варіабельних доменах легких і важких ланцюгів. Найбільш збережені частини називаються каркасними ділянками (FRs). Варіабельні домени нативних важкого і легкого ланцюгів включають до себе чотири FRs, що в основному приймають β -шарову конфігурацію, пов'язану трьома гіперваріабельними ділянками, які формують петльові зв'язки і, в деяких випадках, формують частину β -шарової структури. Гіперваріабельні ділянки в кожному ланцюгу тримаються поряд за допомогою FRs та з гіперваріабельними ділянками іншого ланцюга,

беруть участь у формуванні антиген-зв'язуючого сайту антитіл (див. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константні домени не беруть прямої участі у зв'язуванні антитіла з антигеном, але проявляють різні ефекторні функції, такі як участь антитіл у антитіл-залежній клітинній цитотоксичності (ADCC).

Термін "гіперваріабельна ділянка" у цьому документі означає амінокислотні залишки антитіла, які відповідають за зв'язування антигену. Гіперваріабельна ділянка загалом має в своєму складі амінокислотні залишки "ділянки, що визначає комплементарність" або "CDR", (наприклад, залишки 24-34 (L1), 50-56 (L2) та 89-97 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга, та 31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-102 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), та/або ці залишки з "гіперваріабельної петлі" (наприклад, залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) та 91-96 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга та 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельному домені важкого ланцюга; Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Каркасна ділянка" або "FR"-залишки - це залишки варіабельного домену крім залишків гіперваріабельної ділянки, як зазначено в цьому документі.

Переробка папаїну антитілами призводить до продукування двох ідентичних антиген-зв'язуючих фрагментів, що називаються "Tab"-фрагментами, кожний з одинарним антиген-зв'язуючим сайтом та залишковим "Fc"-фрагментом, чия назва вказує на його здатність кристалізуватися. При лікуванні пепсином виробляється F(ab')₂-фрагмент, який має два антиген-зв'язуючих сайти і здатний утворювати зв'язки з антигеном.

"Fv" - це найменший фрагмент антитіла, який має повний антиген-розпізнавальний і антиген-зв'язуючий сайт. Ця ділянка складається з димеру одного важкого ланцюга і варіабельного домену одного легкого ланцюга у міцній нековалентній асоціації. У такій конфігурації три гіперваріабельні ділянки кожного варіабельного домену взаємодіють для визначення антиген-зв'язуючого сайту на поверхні V_H-V_L-димеру. Разом шість гіперваріабельних ділянок надають антитілу антиген-зв'язуючої специфічності. Незважаючи на це, навіть один варіабельний домен (або половина Fv включає тільки три гіперваріабельні ділянки, специфічні для антигену) має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча і з меншою спорідненістю ніж цілий зв'язуючий сайт.

Fab-фрагмент також має в своєму складі константний домен легкого ланцюга та перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Раb=фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів додаванням кількох залишків на вугле-кінці домену важкого ланцюга CH1, включаючи один або більше цистеїнів з антитільної петльової ділянки. Fab'-SH це назва для Fab,' в якому цистеїновий залишок (залишки) константного домену переносить принаймні одну тіолову групу. P(ab')₂-антитільні

фрагменти спочатку продукувалися як пари Fab'-фрагментів, які мають петлі цистеїну між собою. Також відомі інші хімічні сполучення антитільних фрагментів.

"Легкі ланцюги" антитіл будь-якого виду хребтних на основі амінокислотних послідовностей їх константних доменів можуть бути розподілені на два зовсім різні типи, які називаються каппа (κ) та лямбда (λ).

"Одноланцюгові Fv" або "scFv" антитільні фрагменти включають в себе V_H та V_L домени антитіла, де ці домени присутні у одинарному поліпептидному ланцюгу.

Переважаю Fv-поліпептид має в своєму складі лінкер між V_H та V_L доменами, які дають scFv можливість формувати бажану структуру для зв'язування антигену. Для додаткової інформації щодо scFv дивись Pliickthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). HER2-антитільні scFv-фрагменти описані у WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894 та U.S. Patent No. 5,587,458.

Термін "димерні фрагменти антитіл" означає маленькі фрагменти антитіл з двома антиген-зв'язуючими сайтами, чиї фрагменти мають у своєму складі варіабельний важкий домен (V_H), з'єднаний з варіабельним легким доменом (V_L) тим же поліпептидним ланцюгом (V_H - V_L). Використовуючи лінкер, що є закоротким для того, щоб дозволити зв'язування між двома доменами на тому ж ланцюгу, домени змушені утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга та створювати два антиген-зв'язуючі сайти. Димерні фрагменти антитіл більш повно описані, наприклад, у EP 404,097; WO 93/11161; та Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

"Гуманізовані" форми нелюдських антитіл (наприклад, гризунів) - це химерні антитіла, що мають у своєму складі мінімальну послідовність, похідну від нелюдського імуноглобуліну. У більшості випадків гуманізовані антитіла - це людські імуноглобуліни (реципієнтні антитіла), в яких залишки гіперваріабельної ділянки реципієнта заміщаються залишками нелюдської гіперваріабельної ділянки (донорські антитіла), наприклад, мишачими, щурячими, кролячими або взятими у приматів, що мають бажану специфічність, афінність та функціональну здатність. В деяких прикладах залишки каркасної ділянки (FR) людських імуноглобулінів заміщаються відповідними нелюдськими залишками. Крім того, гуманізовані антитіла можуть мати у своєму складі залишки, які не знаходять ані у антитілах реципієнта, ані у антитілах донора. Такі модифікації робляться для того, щоб покращити функціонування антитіл. Взагалі, гуманізовані антитіла мають у своєму складі майже всі з принаймні одного, а типово - з двох варіабельних доменів, в яких всі або майже всі з гіперваріабельних петель відповідають таким з нелюдського імуноглобуліну і всі, або майже всі, FRs такі ж, як у людській імуноглобуліновій послідовності. Гуманізовані антитіла додатково також мають у своєму складі принаймні частину константної ділянки (Fc) імуноглобуліну, зазвичай такий самий як у людському

імуноглобуліні. Детальніше дивись Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); та Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Гуманізовані HER2-антитіла включають huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 та huMAb4D5-8 або Трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН7), як описано у Table 3 of U.S. Patent 5,821,337, що включається до цього документу як посилання; гуманізовані 520C9 (WO 93/21319) та гуманізовані 2C4 антитіла, як описано в цьому документі.

Терміни "Трастузумаб", "ГЕРЦЕПТИН7" та "huMAb4D5-8" в даному контексті означають антитіло, що включає в себе амінокислотні послідовності легкого та важкого ланцюгів, SEQ ID NOS. 15 та 16, відповідно.

Терміни "Пертузумаб" та "OMNITARGJ" в даному контексті означають антитіло, що включає в себе амінокислотні послідовності легкого та важкого ланцюгів, SEQ ID NOS. 13 та 14, відповідно.

Різниця між функціями Трастузумабу та Пертузумабу проілюстрована на Фіг. 6.

"Неізольоване антитіло" - це антитіло, що не кон'юговане з гетерологічною молекулою, такою як цитотоксична частинка або радіоактивна мітка.

"Ізольоване антитіло" - це те антитіло, яке було ідентифіковане та виділене з компоненту його природного середовища. Домішки з його оточуючого середовища - це матеріали, які можуть впливати на діагностичні або терапевтичні ефекти антитіла і можуть включати в ензими, гормони та інші білкові чи небілкові розчинні речовини. У бажаних варіантах здійснення винаходу, антитіло очищається (1) більш ніж на 95% за вагою антитіла, використовуючи метод Lowry, а краще більш ніж на 99% за вагою, (2) до необхідного ступеню, для того щоб отримати принаймні 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності при використанні чашкового секвенатора, або (3) до гомогенності за допомогою SDS-PAGE при редукованих і не редукованих умовах, використовуючи кумасі блакитний, або краще - срібрілля. Ізольовані антитіла включають в себе антитіла *in situ* у рекомбінантних клітинах доки принаймні один компонент природного середовища антитіла не буде присутнім. Зазвичай ізольовані антитіла готуються принаймні одним способом очистки.

"Аффіно зріле" антитіло - це антитіло з однією або більше альтернацією на одній або більше гіперваріабельній ділянці, які призводять до покращення афінності (спорідненості) антитіла до антигену, у порівнянні з вихідним антитілом, яке не має подібних альтернацій. Аффіно зрілі антитіла, яким надається перевага, мають наномолекулярну або навіть пікомолярну аффіність до антигену-мішені. Аффіно зрілі антитіла виробляються за певною методикою. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) описують афінну зрілість через перестановку VH та VL-доменів. Випадковий мутагенез CDR та/або каркасних залишків описані: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schist 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) та Hawkins et al., J. Mol Biol. 226:889-896(1992).

Термін "антитіло основного виду" означає структуру антитіла в композиції, у складі якої кількісно превалює молекула антитіла в композиції. За одним з варіантів здійснення винаходу, антитілом основного виду є антитіло до HER, таке як антитіло, що зв'язується з Доменом II в HER2, антитіло, що інгібує HER-димеризацію більш ефективно, ніж Трастузумаб та/або антитіло, яке зв'язується з гетеродимерним зв'язуючим сайтом HER2. За бажаним варіантом здійснення винаходу антитіло основного виду включає варіабельні легку та важку амінокислотні послідовності у SEQ ID Nos. 3 та 4 і, найкраще, включає легку та важку амінокислотні послідовності у SEQ ID Nos. 13 та 14 (Пертузумаб).

"Варіант амінокислотної послідовності" антитіла - це антитіло з амінокислотною послідовністю, яка відрізняється від антитіла основного виду. Зазвичай варіанти амінокислотної послідовності мають принаймні близько 70% схожості з антитілом основного виду, та, краще, принаймні близько 80%, і ще краще - принаймні близько 90% схожості з антитілом основного виду. Варіанти амінокислотної послідовності мають заміни, делеції та/або додавання на певних позиціях в або поряд з амінокислотною послідовністю антитіла основного виду. Прикладами варіантів амінокислотної послідовності є ацидитичний варіант (наприклад, варіант дезамінованих антитіл), базовий варіант, антитіло з подовженим аміним кінцем (наприклад, VHS-) на одному або двох його легких ланцюгах, антитіло з C-кінцевим залишком лізину на одному або двох важких ланцюгах тощо, та включає комбінації варіацій амінокислотних послідовностей важкого та/або легкого ланцюгів. Варіант антитіла, що розглядається тут - це антитіло, що включає лідерне подовження на аміно-кінці на його одному або двох легких ланцюгах, а як варіант, воно включає іншу амінокислотну послідовність та/або глікозиловані відмінності з антитілами основного виду.

"Варіант за глікозилюванням" антитіла - це антитіло з прикріпленим одним або кількома вуглеводними фрагментами, які відрізняються від одного або кількох вуглеводних фрагментів, прикріплених до антитіла основного виду. Приклади варіантів за глікозилюванням включають антитіло з олігосахаридною структурою G1 або G2, відмінною від олігосахаридної структури G0, що приєднана до його Fc-ділянки, антитіло з одним або двома вуглеводними фрагментами, приєднаними до його одного або двох легких ланцюгів, антитіло без вуглеводних фрагментів, приєднаних до одного або двох важких ланцюгів антитіла тощо, та комбінації глікозилованих альтернацій.

Якщо антитіло має Fc-ділянку, олігосахаридна структура, як це показано на Фіг. 9, може приєднуватися до одного або двох важких ланцюгів антитіла, наприклад, в залишку 299 (298, Eu нумерації залишків). Для Пертузумабу, G0 була основною олігосахаридною структурою серед інших олігосахаридних структур, таких як GO-F, G-1, Man5,

Man6, G1-1, G1(1-6), G1(1-3) та G2, що були знайдені у меншій кількості у композиції Пертузумабу.

Якщо не сказано інше, "G1-олігосахаридна структура" включає G-1, G1-1, G 1(1-6) та G1(0-3) структури.

Термін "лідерне подовження на аміно-кінці" означає один або кілька амінокислотних залишків лідерної послідовності аміно-кінця, що присутні на аміно-кінці одного чи кількох важких або легких ланцюгів антитіла. Типове лідерне подовження на аміно-кінці включає або складається з трьох амінокислотних залишків, VHS, що знаходяться на одному або обох легких ланцюгах варіанта антитіла.

"Дезамідоване" антитіло - це антитіло, один або більше аспарагінових залишки якого були дерівітазовані, наприклад, до аспарагінової кислоти, сукциніміду або ізо-аспаргунінової кислоти.

Терміни "рак" та "раковий" описують фізіологічний стан у ссавців, що, зазвичай характеризується нерегульованим ростом клітин. Приклади раку включають (але не обмежуються цим): карциному, лімфому, бластоми, (включаючи медулобластоми та ретинобластоми), саркому (включаючи ліпосаркому та сіновіальноклітинну саркому, нейроендокринні пухлини (включаючи карциноїдні пухлини, гастриному та острівцевоклітинний рак), мезотеліому, шваному (включаючи акустичну неврину), менінгіому, аденокарциному, меланому та лейкоз або лімфоїдні пухлини. Більш конкретні приклади таких раків включають лускатноклітинний рак (наприклад, епітеліальний лускатноклітинний рак), легеневи рак, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC), не дрібноклітинний рак легень (NSCLC), аденокарциному легень та лускатноклітинну карциному легень, рак очеревини, гепатоцелярний рак, рак шлунку, включаючи гастроінтестинальний рак, рак підшлункової залози, гліому, черв'ячий рак, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак грудей (включаючи метастатичний рак грудей), рак товстого кишечника, рак прямої кишки, колоректальний рак, ендометріальну або маткову карциному, карциному слинних залоз, рак нирок, рак простати, рак вульви, рак щитоподібної залози, карциному печінки, анальний карцинома, карциному пеніса, рак яєчка, рак стравоходу, пухлини міліарного тракту, та раки голови і шиї.

"Пацієнт" в цьому документі означає людину-пацієнта. Пацієнт може бути "пацієнтом, хворим на рак", тобто таким, у якого проявляються або є ризик прояву одного з симптомів раку, чи інший пацієнт, якому може бути корисне лікування HER-антитілами.

"Біологічний зразок" означає зразок клітин або тканини, що походить з біологічного джерела.

"Зразок пацієнта" означає зразок, взятий у пацієнта, наприклад, пацієнта, хворого на рак.

"Зразок пухлини" - зразок, отриманий з пухлини пацієнта і містить її клітини. Приклади зразків пухлини включають (але не обмежуються): біопсію пухлини, циркулюючі пухлинні клітини, циркулюючі білки плазми, асцитичну рідину, первинні культури клітин, або ряди клітин, отримані з пухлин, або ті, що виявляють пухлинні властивості та законсер-

вовані пухлинні зразки такі, як зафіксовані формаліном, парафіном, або заморожені зразки пухлин.

"Фіксований" зразок пухлини - це зразок, що його гістологічно приготовано з використанням фіксатору.

"Фіксований формаліном" зразок пухлини - це зразок, що його приготовано з використанням формальдегіду як фіксатора.

"Залитий" зразок пухлини - це зразок, що його оточено твердим, зазвичай середньої твердості, матеріалом, таким як парафін, віск, целоїдин або смола. Заливка робить можливим нарізання тонких препаратів для мікроскопічного дослідження або генерації мікрмасивів (TMAs).

"Залитий парафіном" зразок пухлин - це зразок, оточений очищеною сумішшю твердих гідрокарбонатів, похідних нафти.

Термін "заморожений" зразок пухлини означає в цьому документі зразок, який є чи було заморожено.

Раковий або біологічний зразок, який "демонструє HER-експресію, ампліфікацію або активацію" - це такий зразок, який при діагностичному тесті експресує (включаючи надекспресію) HER-рецептор, має ампліфікований HER-ген, та/або поіншому демонструє активацію або фосфориліацію HER-рецептора. Така активація може бути визначена прямо (наприклад, шляхом вимірювання HER-фосфориліації) або опосередковано (наприклад, шляхом аналізу генної експресії або визначення HER-гетеродимерів, як описано в цьому документі).

Рак з "надекспресією або ампліфікацією HER-рецептора" - це той, що має значно вищі рівні білка або гена HER-рецептора у порівнянні з нераковою клітиною того ж типу тканин. Така надекспресія може бути спричинена генною ампліфікацією або зростанням транскрипції чи трансляції. Надекспресія або ампліфікація HER-рецептора у діагностичних або прогностичних пробах можуть бути спричинені оцінкою зростаючих рівнів HER-білка, що знаходиться на поверхні клітини (наприклад, при імуногістохімічному аналізі; IHC). Альтернативно або додатково можна використовувати вимірювання рівнів HER-кодуючої нуклеїнової кислоти в клітині, наприклад, шляхом флюоресценції in situ гібридизації (FISH; дивись WO98/45479 опублікований у жовтні 1998р), саузерн-блоттингу, або полімеразної ланцюгової реакції (PCR), такої як кількісна PCR в реальному часі (qRT-PCR). Можна також вивчати надекспресію або ампліфікацію HER-рецептора вимірюючи антиген, що "злуцується" (наприклад, HER-екстрацелярний домен) у біологічній рідині, такий як сироватка (дивись, наприклад, U.S. Patent No. 4,933,294, виданий 12 червня 1990р.; WO 91/05264, опублікований 18 квітня 1991р.; U.S. Patent 5,401,638, виданий 28 березня 1995р. та Sias et al. J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). Крім перерахованих вище дослідів, існують in vivo-досліди для досвідченого спеціаліста. Наприклад, можна піддавати клітини пацієнта впливу антитіл, мічених, наприклад, радіоактивним ізотопом, при цьому можна оцінити зв'язування антитіл з клітинами пацієнта, наприклад, використовуючи зовнішнє сканування радіо-

активності або аналізуючи біопсію, взятую у пацієнта, підданого впливу антитіл.

І навпаки, рак, який "не надекспресує або не ампліфує HER-рецептори", - це той, що не має вищі за норму рівні білка або гену HER-рецептора у порівнянні з нераковою клітиною того ж типу тканин. Антитіла, що інгібують HER-димеризацію, такі як Пертузумаб, можуть використовуватися у лікуванні раку, який не надекспресує або не ампліфікує HER2-рецептори.

Термін "агент, що інгібує ріст" означає у цьому документі суміш або композицію, яка інгібує ріст клітини, особливо HER-експресуючої ракової клітини *in vitro* та *in vivo*. Таким чином, рости-інгібуючим агентом може бути той, що значно зменшує процент HER-експресуючих клітин у S-фазі. Прикладами ріст-інгібуючих агентів можуть бути агенти, що блокують циклічну прогресію клітин (не в S-фазі), такі як агенти, що індують затримку G1- та M-фаз. Класичні блокатори M-фази включають Вінкас (Вінкрістин та Вінбластин), Таксанес та топо II інгібітори, такі як Доксорубіцин, Епірубіцин, Даунорубіцин, Етопозид, та Блеоміцин. Ці агенти затримують G1, а також затримують S-фазу, наприклад агенти, що алкілюють ДНК, такі як Тамоксіфен, Преднізон, Дакарбазін, Мехлоратамін, Ципластин, Метотрексат, 5-фторурацил та Ара-С. Детальнішу інформацію можна знайти у *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn та Israel, eds., Chapter 1, що названа "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особливо стор. 13.

Прикладами антитіл, що "інгібують ріст" є ті, що зв'язуються з HER2 та інгібують ріст ракових клітин, що надекспресують HER2. Бажані антитіла до HER2, що інгібують ріст, інгібують ріст SK-BR-3 клітин пухлини грудей в культурі клітин більш ніж на 20%, та краще, більше ніж на 50% (наприклад, з приблизно 50% до приблизно 100%) при концентрації антитіл приблизно 0.5 - 30 $\mu\text{g/ml}$, де пригнічення росту визначається через шість днів після впливу антитіл на SK-BR-3 клітини (дивись U.S. Patent No. 5,677,171, виданий 14 жовтня 1997р). Досліди з пригніченням SK-BR-3-клітин описані детальніше в зазначеному патенті та нижче. Найбажанішим антитілом, що інгібує ріст, є гуманізований варіант мишачого моноклонального антитіла 4D5, наприклад, Трастузумаб.

Антитіло, що "індукує апоптоз" - це антитіло, що індукує запрограмовану смерть клітини, що визначається зв'язуванням аннексину V, фрагментацією ДНК, стисканням клітини, дилатацією ендоплазматичного ретикулуму, фрагментацією клітини та/або формуванням мембранних пухирців (які називаються апоптичними тільцями). Зазвичай така клітина надекспресує HEK2-рецептор. Переважно це пухлинна клітина, наприклад, грудна яєчникова, шлункова, ендометріальна, слинної залози, легенева, ниркова, кишечникова, тиреоїдна, панкреатична, міхурова клітина. *In vitro*, клітина може бути K-BR-3, BT474, Calu 3 cell, MDA-MB-453, MDA-MB-361 або SKOV3 клітиною. Існують різні методи для оцінки того, що відбувається з клітиною у зв'язку з апоптозом. Наприклад, тран-

локація фосфатиділ серину (PS) може вимірюватися зв'язуванням аннексину, фрагментація ДНК може бути оцінена по ступеневості ДНК та нуклеарно/хроматиновій конденсації, разом з тим ДНК-фрагментація може бути оцінена по зростанню в будь-якій гіподиплоїдній клітині. Переважно, антитіло, що індукує апоптоз, - це те, що викликає приблизно 2-50 скручувань, а краще, приблизно 5-50 скручувань та найкраще - приблизно 10-50 скручувань, індукція зв'язування аннексину близька до нелакованої клітини в досліді зі зв'язуванням аннексину, використовуючи BT474 клітини (дивись нижче). Приклади HER2-антитіл, що індують апоптоз - це 7C2 та 7F3.

"Епітоп 2C4" - це ділянка в екстрацелюлярному домені HER2, до якої приєднується антитіло 2C4. Для виявлення антитіл, що приєднуються до епітопу 2C4, може проводитися звичайний дослід з перехресним блокінгом, так як це описано у *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Переважно антитіло блокує приєднання 2C4 до HER2 на приблизно 50% або більше. Як альтернатива може проводитися картування епітопів для визначення, чи приєднується антитіло до епітопу 2C4 HER2. Епітоп 2C4 включає в себе залишки Домену II в екстрацелюлярному домені HER2. 2C4 та Пертузумаб приєднуються до екстрацелюлярного домену HER2 у з'єднанні доменів I, II та III. Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004).

"Епітоп 4D5" - це ділянка в екстрацелюлярному домені HER2, до якої приєднуються антитіло 4D5 (ATCC CRL 10463) та Трастузумаб. Цей епітоп близький до трансмембранного домену HER2 та до Домену IV HER2. Для виявлення антитіл, що приєднуються до епітопу 4D5, може проводитися звичайний дослід з перехресним блокінгом, так як це описано у *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Як альтернатива може проводитися картування епітопів для визначення чи приєднується антитіло до епітопу 4D5 HER2 (наприклад, будь-який з епітопів в ділянці від приблизно 529 залишку до приблизно 625 залишку, що включають HER2 ECD, залишки нумеруються, враховуючи сигнальні пептиди).

"Епітоп 7C2/7F3" - це ділянка на N-кінці в Домені I екстрацелюлярного домену HER2, до якої приєднуються 7C2- та/або 7F3-антитіла (кожне, осажене за допомогою ATCC, дивись нижче). Для скринінгу антитіл, що приєднуються до епітопу 7C2/7F3, може проводитися звичайний дослід з перехресним блокінгом, так як це описано у *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Як альтернатива, може проводитися картування епітопів для визначення чи приєднується антитіло до епітопу 7C2/7F3 HER2 (наприклад, будь-який з епітопів в ділянці від приблизно 22 залишку до приблизно 53 залишку, що включають HER2 ECD, залишки нумеруються, враховуючи сигнальні пептиди).

"Лікування" означає як терапевтичне лікування, так і профілактичні або превентивні заходи. До осіб, що потребують лікування, відносяться як ті,

що вже мають хворобу, так і ті, у кого хвороба попереджається. Таким чином, пацієнт, якого лікують, може бути вже зі встановленим діагнозом або може бути схильним чи чутливим до хвороби.

Термін "ефективна кількість" означає кількість ліків, достатню для лікування раку у пацієнта. Ефективна кількість ліків може зменшувати кількість ракових клітин; зменшувати розміри пухлини; інгібувати (тобто уповільнити до певної міри, а в найкращому разі - зупинити) інфільтрацію периферичних органів раковими клітинами; інгібувати (тобто уповільнити до певної міри, а в найкращому разі - зупинити) пухлинні метастази; інгібувати певною мірою ріст пухлини; та/або полегшити певною мірою один або більше симптомів, що викликаються раком. Певною мірою ліки можуть попередити ріст та/або вбити існуючі ракові клітини, вони можуть бути цитостатичними та/або цитотоксичними. Ефективна кількість може подовжити виживання без прогресії (наприклад, як вказано у Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST та CA-125 зміни), викликати об'єктивну відповідь (включаючи часткову відповідь, PR, або повну відповідь, CR), спричинити зростання загального часу виживання, та/або полегшити один або більше симптомів раку (наприклад, як досліджено FOSI).

"Загальний час виживання" означає підтримання життя пацієнта протягом певного періоду, такого як 1 рік, 5 років тощо, наприклад, з часу встановлення діагнозу або лікування.

"Виживання без прогресії" означає підтримання життя пацієнта без погіршення раку. "Об'єктивна відповідь" означає відповідь, яку можна виміряти, включаючи повну відповідь (CR) або часткову відповідь (PR).

"Повна відповідь" або "повна ремісія" передбачає зникнення всіх ознак раку у відповідь на лікування. Це не завжди означає виліковування раку.

"Часткова відповідь" передбачає зменшення розміру однієї або більше пухлин або уражень чи поширення раку у тілі у відповідь на лікування.

Термін "цитотоксичний агент" використовується у цьому документі для позначення субстанції, що інгібує або попереджує функціонування клітин та/або спричиняє деструкцію клітин. Термін передбачає радіоактивні ізотопи (наприклад, At^{211} , I^{131} , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P та радіоактивні ізотопи Lu), хіміотерапевтичні агенти та токсини, такі як дрібномолекулярні токсини або ферментативно-активні молекули бактеріального, грибкового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти/або варіанти.

"Хіміотерапевтичний агент" - це хімічне з'єднання, корисне при лікуванні раку. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають алкілюючі агенти, такі як Тіотеп та ЦИТОКСАН7, Циклофосфамід; алкіловані сульфони, такі як Бусульфан, Імпросульфан та Піпосульфан; азирідини, такі як Бензодоп, Карбоконт Метуредопа та Уредопа; етіленіміни та метиламіламіни, включаючи Альтерамін, Третіленемеламін, Третіленефосфорамід, Третіленетіофосфорамід та Триметіллофосфорамін; TLK 286 (ТЕЛЦИТАЙ); ацтогеніни

(особливо Буллатацин та Буллатацінон); дельта-9-тетрагідроканнабіол (Дронабіол, МАРІНОЛ7); бета-лапахон; лапахол; колхіцини; бетулініцинову кислоту; камптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекан (ПКАМТІН7), СРТ-11 (іринотекан, КАМПТОСАР7), ацетилкамптотецин, скополектин та 9-амінокампротектин); бріостатин; каллістатин; СС-1065 (включаючи синтетичні аналоги Адозелезіну, Карзелезіну та Бізелезіну); подофіллотоксин; подофіллініцинова кислота; теніпозид; кріптофіцин (особливо кріптофіцин 1 та кріптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги, KW-2189 та СВ1-ТМ1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодіктин; спонгістатин; азотистий іприт такий як Хлорамбуцил, Хлорнафазин, Холофосфамід, Естрамуцин, Іфосфамід, Мехлоретамін, Мехлоретамін оксид гідрохлорид, Мелфалан, Новембіксін, Фенестрин, Преднімустин, Трофосфамід, урациловий іприт; нітросурацил, такі як Кармуцин, Хлорзотоцин, Фотемустин, Ломустин, Німуцин та Ранімустин; бісфосфонати, такі як Клодронат; антибіотики, такі як енедіноні антибіотики (наприклад, Каліхеаміцин, особливо Каліхеаміцин гаммал та Каліхеаміцин омега-1 (дивись, наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994)) та 5 антрацикліни, такі як Аннаміцин, AD 32, Алкарубіцин, Даунорубіцин, Дексароксан, DX-52-1, Епірубіцин, GPX-100, Ідарубіцин, KRN5500, Меногарил, Динеміцин, включаючи Динеміцин А, Еспераміцин, Неокарзіностатин Хромофор та споріднені Хромопротектин енедіноні антибіотики хромофори, аклаціноміцини, Актиноміцин, Аутраміцин, Азасерін, Блеміцин, Кактіноміцин, Карабіцин, Карміноміцин, Карзінофілін, Хромоміцин, Дактіноміцин, Деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлеуцин, АДРІАМАЦІН7, Доксорубіцин (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-пірроліно-доксорубіцин, ліпосомальний доксорубіцин та деіксидоксорубіцин), езорубіцин, марселоміцин; мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолева кислота, ногаламіцин, олівоміцин, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидін, убенімекс, зіностатин, та зорубіцин; аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, птероптерин, та триметрексат; аналоги пуринів, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміпурин та тіогуанін; аналоги піримідинів, такі як анцитабін, азацитидін, 6-азауридин, кармо фур, цитарабін, дідеоксиридин, доксіфлуридин, еноцитабін, та флоксуридин, оксіфлуридин, еноцитабін, та флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епістанол, мепітіостан та тестостерон; анти адреналіноні, такі як аміноглутетамід, мітотан та трілостан; додаток фолієвої кислоти, такий як фолієва кислота (лейковарин); ацетглатон; анти-фолатові антинеопластичні агенти, такі як ALIMTA7, LY231514; дігідрофолатові інгібітори редуктази, такі як метотрексат; антиметаболіти, такі як 5-фторурацил (5-FU) та його проліки, такі як UFT, S-1 та капецитабін, та інгібітори тимідилатсинтетази, та інгібітори гліцинамід рибонуклеотид формілтрансферази, такі як ралтітрект (ТОМУ-ДЕКС^{RM}, TDX); інгібітори дигідропіримідиндегідрогенази, такі як енілурацил; альдофосфамідгліко-

зид; амінолевулінова кислота; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едатраксат; дефофамін; демеколцин; діазіквон; елфорнітин; елліптініума ацетат; епотилон; етоглоїд; галліуму нітрат; гідроксіуреа; лентінан; лонідаїнін; мейтансіноїди, такі як мейтансін та ансамітоцин; мітогуазон; мітоксантрон; мопіндамон; нітраерин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; 2-етилхідрозид; прокарбазин; PSK.7 полісахаридний комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; різоскін; сізоферан; спірогерманіум; тенуазонієва кислота; триазіквон; 2,2',2"-трихлоротриетиламін; трихотецени (особливо Т-2 токсин верракурин А, рорідин А та ангідин); уретан; віндезин (ELDISINE7, FILDESIN7); дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди та таксани, наприклад, TAXOL7 паклітаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ безкремофорові, альбумінові наночастинки формування паклітакселю (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), та TAXOTERE7 доцетаксель (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабін (GEMZAR7); 6-тіогуанін; меркаптопурин; платина; аналоги платини або аналоги, що базуються на платині, такі як цисплатин, оксалиплатин та карбоплатин; вінбластин (VELBAN7); етопозид (VP-16); ізофамід; мітоксантрон; вінкрестин (ONCOVIN7); алкалоїд барвінку; вінорелбін (NAVELBINE7); новантрон; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; інгібітор топоізомерази RFS 2000; діфлюорометилорнітин (DMFO); кретиніди, такі як ретиноїва кислота; фармацевтично здобувані солі, кислоти або похідні будь чого з перерахованого вище або їхні комбінації, такі як CHOP, аббревіатура для комбінованої терапії циклофосфамідом, доксорубіцином, вінкрестином та преднізолоном, та FOLFOX, аббревіатура курсу лікування оксалиплатиною (ELOXATIN™), комбінованим з 5-FU та лейковарином.

Також це визначення включає антигормональні агенти, що впливають на регуляцію або інгібіцію дії гормонів на пухлини, такі як анти-естрогени та селективні естрогенові рецептори-модулятори (SERMs), включаючи NOLVADEX7 тамоксіфен (включаючи NOLVADEX7 тамоксіфен), ралоксіфен, дролоксіфен, 4-гідроксітамоксифен, тріоксіфен, кеоксіфен, LY117018, онапристон, та FARESTON7 тореміфен; інгібітори ароматази, які інгібують фермент аромат азу, який регулює продукцію естрогенів в наднирниках, такі як, наприклад, 4(5)-імідазол, аміноглютетимід, MEGASE7 мегестролу ацетат, AROMASIN7 екземестан, форместан, фандрозол, RIVISOR7 ворозол, FEMARA7 летрозол, та ARIMIDEX7 анатрозол; та анти андрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, леупроділ, та госсерелін; та троксітабін (аналог 1,3-діоксолан-нуклеозид-цитозину); антизмістовні олігонуклеотиди, особливо ті, що інгібують експресію генів в сигнальних шляхах, що знаходяться у абберантних клітинах проліферації, такі як, наприклад, PKC-альфа, Raf, H-Ras, та епідермальний фактор росту (EGF-R); вакцини, такі як генні терапевтичні вакцини, наприклад, ALLOVECTIN7 вакцина,

LEUVECTIN7 вакцина та VAXID7 вакцина; PROLEUKIN7 rIL-2; LURTOTECAN7 інгібітор топоізомери 1, ABARELIX7 mRn; та отримані фармацевтично солі, кислоти або їх похідні.

"Антиметаболічний хіміотерапевтичний агент" - це агент, який структурно схожий з метаболітом, але не може бути використаний організмом для продуктивних цілей. Багато антиметаболічних хіміотерапевтичних агентів мають вплив на продукцію нуклеїнових кислот, РНК та ДНК. Приклади антиметаболічних хіміотерапевтичних агентів включають гемцитабін (GEMZAR7), 5-фторурацил (5-FU), капецитабін (XELODAJ), 6-меркаптопурин, метотрексат, 6-тіогуанін, пеметрексед, ралтітрексед, арабіносилцитозин ARA-C цитарабін (CYTOSAR-U7), дакарбазин (DTIC-DOME7), азоцитозин, деоксцитозин, піридміден, флударабін (FLUDARA7), кладрабін, 2-деоксі-О-глюкоза, етс. Найбажаніший антиметаболічний хіміотерапевтичний агент - це Гемцитабін.

"Гемцитабін" або "2'-деоксі-2', 2'-діфлюороцитидін моногідрохлорид (b-ізомер)" - це нуклеозидний аналог, який проявляє протипухлинну дію. Емпірична формула Гемцитабіну HCl - це C₉H₁₁F₂N₃O₄ A HCl. Гемцитабін HCl продається Eli Lilly під торговою маркою GEMZAR7.

"Хіміотерапевтичний агент, що базується на платині" означає органічну суміш, яка має в своєму складі платину у якості складової частини молекули. Приклади хіміотерапевтичного агента, що базується на платині, включають карбоплатин, цисплатин та оксалиплатин.

"Хіміотерапія, що базується на платині" - передбачає терапію одним або більше хіміотерапевтичним агентом, що базується на платині, або у комбінації з одним або більше хіміотерапевтичним агентом.

"Платино-резистентний" рак - рак, що прогресує під час отримання хіміотерапії, що базується на використанні платини (тобто пацієнт є "платино-рефрактерним"), або у пацієнта спостерігається прогресування хвороби терміном до 12 місяців (наприклад, до 6 місяців) після закінчення курсу хіміотерапії, що базується на використанні платини.

"Антиангіогенний агент" означає речовину, що блокує або певною мірою впливає на розвиток кровоносних судин. Антиангіогенний фактор може, наприклад, бути дрібною молекулою або антитілом, яке приєднується до фактору росту або рецептору фактора росту, які беруть участь у стимуляції ангіогенезу. Бажаний антиангіогенний фактор - це антитіло, яке приєднується до ендотеліального фактору росту судин (VEGF), наприклад, Бевацизумаб (AVASTIN7).

Термін "цитокін" - це загальна назва білків, вироблених однією популяцією клітин, які впливають на інші клітини як клітинні медіатори. Прикладами таких цитокінів є лімфокіни, монокіни та звичайні поліпептидні гормони. Серед цитокінів є гормони росту, такі як людський гормон росту, N-метіонін гормон росту людини та бичачий гормон росту; паратиреоїдний гормон; тироксин; інсулін; проінсулін; релаксин; прорелаксин; глікопротеїнові гормони, такі як фолікулостимулюючий гормон FSH),

тириодстимулюючий гормон (TSH), та лютетінізуючий гормон (LH); печінковий фактор росту; фактор росту фібробластів; пролактин; плацентарний лактоген; фактор неурозу пухлин- α та - β ; мюллерово-інгібуюча речовина; мишачий гонодотропін-асоційований пептид; інгібін; активін; ендотеліальний фактор росту судин; інтегрин; тромбопоетин (TPO); фактор росту нервів, такий як NGF- β ; фактор росту тромбоцитів; трансформуючі фактори росту (TGFs), такі як TGF- α та TGF- β ; інсуліноподібний фактор росту-I та -II; еритропоетин (EPO); остеоіндуктивні фактори; інтерферони, такі як інтерферон- α , - β , та - γ ; колоніє стимулюючі фактори (CSFs), такі як макрофаг-CSF (M-CSF); гранулоцит-макрофаг-CSF (GM-CSF) та гранулоцит-CSF (G-CSF); інтерлейкіни (ILs), такі як IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; фактори некрозу пухлин, такі як TNF- α або TNF- β та інші поліпептидні фактори, включаючи LIF та набір ліганд (KL). В даному тексті, термін цитокін включає білки з природних джерел або з рекомбінантних культур клітин та біологічно активні еквіваленти нативної послідовності цитокінів.

Термін "EGFR-спрямовані ліки" означає терапевтичний агент, що приєднується до EGFR та значно інгібує активацію EGFR. Приклади таких агентів включають антитіла та дрібні молекули, що приєднуються до EGFR. Приклади антитіл, що приєднуються до EGFR, включають MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (дивись US Patent No. 4,943,533, Mendelsohn et al.) та їхні варіанти, такі як химеризований 225 (C225 або Цетуксімаб; ERBUTIX7) та переформований людський 225 (H225) (див. WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); антитіла, що зв'язують тип II мутантних EGFR (US Patent No. 5,212,290); гуманізовані та химерні антитіла, що зв'язують EGFR як описано у US Patent No. 5,891,996; та людські антитіла, що зв'язують EGFR, такі як ABX-EGF (дивись WO 98/50433, Abgenix); EMD 55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A:636-640 (1996)); та mAb 806 або гуманізований mAb 806 (Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)). Анти-EGFR антитіла можуть бути кон'юговані з цитотоксичним агентом, таким чином, генеруючи імунокон'югат (дивись, наприклад, EP659,439A2, Merck Patent GmbH). Приклади дрібних молекул, які приєднуються до EGFR, включають ZD1839 або Gefітініб (IRESSA; Astra Zeneca); CP-358774 або Ерлотініб HCL (TARCEVA; Genentech/OSI); та AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen).

"Інгібітор тирозинкінази" - молекула, яка інгібує тирозинкіназу активність тирозинкіназ, таких як HER-рецептор. Прикладами таких інгібіторів є EGFR-спрямовані ліки, зазначені у попередньому абзаці; дрібномолекулярний HER2-тирозинкіназний інгібітор, такий як TAKI65, що поставляється Takeda; подвійні HER-інгібітори, такі як EKB-569 (що поставляється Wyeth), які переважно зв'язують EGFR, але інгібують і HER2, і EGFR-надекспресуючі клітини; GW572016 (що поставляється Glaxo); оральний HER2 та EGFR тирозинкіназний інгібітор; PKI-166 (що поставляється

Novartis); пан-HER інгібітори, такі як канертініб (CI-1033; Pharmacia); Raf-1 інгібітори, такі як антимістовний агент ISIS-5132, що поставляється ISIS Pharmaceuticals, який інгібує Raf-1 сигналізацію; не HER-спрямовані TK-інгібітори, такі як Іматініба мезилат (Gleevec), що поставляється Glaxo; MAPK інгібітор екстрацелюлярної регульованої кінази I - CI-1040 (що поставляється Pharmacia); квіназоліни, такі як PD 153035,4-(3-хлоранілін) квіназолін; піримідини; піримідопіримідини; пірролопіримідини, такі як CGP 59326, CGP 60261 та CGP 62706; пірозолопіримідини, 4-(феніламін)-7H-пірроло[2,3-d] піримідини; куркумін (діферулоїл метан, 4,5-біс (4-флуоранілін)фталімід); тирфостін, що включає частинки нітрофену; PD-0183805 (Warner-Lambert); антимістовні молекули (наприклад, ті, що приєднуються до нуклеїнової кислоти, що кодує HER); квіноксаліни (US Patent No. 5,804,396); трифостін (US Patent No. 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); пан-HER інгібітори, такі як CI-1033 (Pfizer); Аффінітак (ISIS 3521; Isis/Lilly); Іматініба мезилат (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Семаксініб (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-ICI 1 (Imclone); або як описано в будь-якій з наступних патентних публікацій: US Patent No. 5,804,396; WO 99/09016 (American Cyanimid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, hie); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); and WO 96/33980 (Zeneca).

"Аутоімунна хвороба" - в цьому документі означає хворобу або розлад, що походить з та спрямований проти власних тканин людини, або є його результатом чи проявом або обумовлюється ним. Приклади аутоімунних хвороб або розладів включають, (але не обмежуються ними) артрит (ревматоїдний артрит, такий як гострий артрит, хронічний ревматоїдний артрит, подагричний артрит, гостра подагра, гострий подагричний артрит, хронічний запальний артрит, дегенеративний артрит, інфекційний артрит, хвороба Дайма, проліферативний артрит, псоріатичний артрит, хребцевий артрит та ювенільний ревматоїдний артрит, остеoarтрит, гострий прогресуючий артрит, деформуючий артрит, первинно хронічний поліартрит, реактивний артрит та анкілозуючий спонділіт), запальні гіперпроліферативні захворювання шкіри, псоріаз, такий як бляшковий псоріаз, кришковий псоріаз, пустулярний псоріаз та псоріаз нігтів, atopія, включаючи atopічні хвороби такі як сінна лихоманка та синдром Джоба, дерматити включаючи контактний дерматит, хронічний контактний дерматит, алергічний дерматит, алергічний контактний дерматит, герпетіформний дерматит та atopічний, дерматит, пов'язаний з X-хромосомою гіпер-IgM синдром, кропивниці, такі як хронічна алергічна кропивниця та хронічна ідіопатична кропивниця, включаючи хронічну аутоімунну кропивницю, поліміозит/дерматоміозит, ювенільний дерматоміозит, токсичний епідермальний некроліз, склеродермія (включаючи системну склеродермію), склероз такий як системний склероз, множинний склероз

(MS) такий як спінально-оптичний MS, первинний прогресивний MS (PPMS), та рецидивуючий ремітуючий MS (RRMS), прогресуючий системний склероз, атеросклероз, артеріосклероз, дисемінований склероз та атаксичний склероз, запальна хвороба кишок (IBD) (наприклад, хвороба Крона, аутоімунно опосередковані гастроінтестинальні хвороби, коліт, такий як виразковий коліт, мікроскопічний коліт, колагенозний коліт, поліпозний коліт, некротичний ентероколіт та трансмуральний коліт та аутоімунна запальна хвороба кишок), гангренозна піодермія, вузлова еритема, первинний склерозуючий холангіт, епісклерит), респираторний дистрес-синдром, включаючи дорослий або гострий респираторний дистрес-синдром, (ARDS), менінгіт, запалення всіх частин судинної оболонки ока, ірит, хороїдит, аутоімунний гематологічний розлад, ревматоїдний спонділіт, раптова втрата слуху, IgE-опосередковані хвороби, такі як анафілаксія та алергічний і atopічний риніт, енцефаліт, такий як енцефаліт Расмусена та лімбічний та/або стовбуровий енцефаліт, увеїт, такий як передній увеїт, гострий передній увеїт, грануломатозний увеїт, негрануломатозний увеїт, *erios uveitis*, *granulomatous uveitis*, *nongranulomatous uveitis*, факоантисгенний увеїт, задній увеїт або аутоімунний увеїт, гломерулонефрит (GN) з або без нефротичного синдрому такий як хронічний або гострий гломерулонефрит, такий як первинний GN, імунноопосередкований GN, мембранозний GN (мембранозна нефропатія), ідіопатичний мембранозний GN або ідіопатична мембранозна нефропатія, мембрано- або мембранозний проліферативний GN (MPGN), включаючи Тип I та Тип II, та швидкопрогресуючий GN, алергічні стани та відповіді, алергічна реакція, екзема, включаючи алергічну або atopічну екзему, астма, така як бронхіальна астма, та аутоімунна астма, стани, що викликають інфільтрацію T-клітинами, та хронічні запальні відповіді, імунні реакції проти чужорідних антигенів таких як фетальні A-B-0 групи крові протягом вагітності, хронічна запальна хвороба легень, аутоімунний міокардит, недостатність адгезії лейкоцитів, системний червоний вовчак (SLE) або системний люпусний еритематоз такий як шкірний SLE, подгострий шкірний люпусний еритематоз, неонатальний люпусний синдром (NLE), дисемінований люпусний еритематоз, люпус (включаючи нефрит, церебрит, дитячий, не нирковий, екстра нирковий, дискоїдний, алопеція), ювенільний початок діабету (Тип 1), включаючи дитячий інсулінзалежний діабет (EDDM), початок діабету у дорослому віці (Тип 2), аутоімунний діабет, ідіоматичний нецукровий діабет, імунні відповіді, асоційовані з негайною та відстроченою гіперчутливістю, що виникає під впливом цитокінів та Т-лімфоцитів, туберкульоз, саркоїдоз, грануломатоз, включаючи лімфатоїдний грануломатоз, грануломатоз Вагнера, агранулоцитоз, васкуліти, включаючи васкуліт (включаючи васкуліт великих судин (включаючи ревматичну поліміалгію та гігантоклітинний артеріїт (Такаясу)), васкуліт судин середнього калібру (включаючи хворобу Кавасаки та вузловий/ вузловий періартеріальний поліартрит, мікроскопічний поліартрит, CNS-васкуліт, некротичний, шкірний

або гіперчутливий васкуліт, системний некротизуючий васкуліт та ANCA-асоційований васкуліт, такий як васкуліт або синдром Чурга-Штрауса (CSS)), тем'яний артеріїт, апластична анемія, аутоімунна апластична анемія, Кумбс-позитивна анемія, анемія Даймонда-Блекфана, гемолітична анемія або імунна гемолітична анемія, включаючи аутоімунну гемолітичну анемію (АША), перніціозну анемію (*anemia perniosa*), Аддисонову хворобу, анемію з малою кількістю еритроцитів або аплазію (PRCA), дефіцит VIII фактору, гемофілія А, аутоімунна нейтропенія, панцитопенія, лейкопенія, хвороби, що викликають лейкоцитарний діapedез, CNS-запальні розлади, синдром множинного ураження органів, такий як внаслідок септицемії, травми або кровотечі, хвороби, медіатором яких є антиген-антитільний комплекс, хвороба антигломерулярної базальної мембрани, антифосфоліпідний антитільний синдром, алергічний неврит, хвороба Бекета, синдром Кастелмана, синдром Гудпастчера, синдром Рейно, синдром Шенгрена, синдром Стівена-Джонсона, пемфігоїд, такий як бульозний пемфігоїд та шкірний пемфігоїд, пемфігоїд (включаючи пемфігоїд вульгарний, пемфігоїд листоподібний, пемфігоїд слизових мембран та еритрематозний пемфігоїд), аутоімунні поліендокринопатії, хвороба або синдром Рейтера, імуннокомплексний нефрит, антитільноопосередкований нефрит, оптичний нейромієліт, полінейропатія, хронічна нейропатія, така як IgM-полінейропатія, або IgM-опосередкована нейропатія, тромбоцитопенія (така як, наприклад, розвивається у пацієнтів з інфарктом міокарду), включаючи тромбоцитопенічну пурпуру (TTP), посттрансфузійну пурпуру (PTP), гепарин-індуковану тромбоцитопенію та аутоімунну або імунноопосередковану тромбоцитопенію, таку як ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура (ITP), включаючи хронічну або гостру ITP, аутоімунна хвороба яєчок та яєчників, включаючи аутоімунний орхіт та оофорит, первинний гіпотиреоїдизм, гіпопаратиреоїдизм, аутоімунні ендокринні захворювання, включаючи тиреоїдит, такий як аутоімунний тиреоїдит, хворобу Хашимото, хронічний тиреоїдит (тиреоїдит Хашимото), або підгострий тиреоїдит, аутоімунне тиреоїдне захворювання, ідіоматичний гіпотиреоїдизм, хвороба Грейвса, полігландулярні синдроми такі як аутоімунні полігландулярні синдроми (або синдроми полігландулярних ендокринопатій), паранеопластичні синдроми, включаючи неврологічні паранеопластичні синдроми такі як міастенічний синдром Ламберта-Ітона або синдром Ітона-Ламберта, синдром застиглої людини, енцефаломієліт, такий як алергічний енцефаломієліт або енцефаломієлітс аллерджіка та експериментальний алергічний енцефаломієліт (EAE), міастенія гравіс така як тимома-асоційована міастенія гравіс, мозочкові дегенерація, нейроміотонія, опсоклонус або опсоклонічний міоклонічний синдром (OMS), та сенсорна нейропатія, мультифокальна моторна нейропатія, синдром Шихана, аутоімунний гепатит, хронічний гепатит, люпоїдний гепатит, гігантоклітинний гепатит, хронічний активний гепатит або аутоімунний хронічний активний гепатит, лімфоїдний інтерстиціальний пневмоніт (LIP), облітують

чий бронхіоліт (не трансплантанти) vs NSIP, синдром Гієна-Барре, хвороба Бергера (IgA нефропатія), ідіопатична IgA нефропатія, лінійний IgA дерматоз, первинний міліарний цироз, пневмоцироз, синдром аутоімунної ентеропатії, синдром сонячного сплетіння, целиакія, целиакічні афти (глютенова ентеропатія), рефрактерні афти, ідіопатичні афти, кріоглобулінемія, аміотрофічний латеральний склероз (ALS; хвороба Лу-Геріга), хвороба коронарних артерій, аутоімунна хвороба вух така як аутоімунна хвороба внутрішнього вуха (AIED), аутоімунна втрата слуху, опсуклонічний міоклонічний синдром (OMS), полі хондрит такий як рефрактерний або поворотний полі хондрит, альвеолярний протеїном легень, амілоїдоз, склерит, нераковий лімфоцитом, первинний лімфоцитом, який включає моноклональний В-клітинний лімфоцитоз (e.g., доброякісна моноклональна гаммапатія та моноклональна гаммапатія невизначеного значення, MGUS), периферична нейропатія, паранеопластичний синдром, каналопатії такі як епілепсія, мігрень, аритмія, м'язові розлади, глухота, сліпота, періодичний параліч, та каналопатії ЦНС, аутизм, запальна міопатія, фокальний сегментарний гломерулосклероз (FSGS), ендокринна офтальмопатія, увеоретиніт, хоріоретиніт, аутоімунні гепатологічні розлади, фіброміалгія, множинні ендокринні розлади, синдром Шмідта, адреналіт, атрофія шлунку, пресенільна деменція, демієлінізуючі захворювання такі як аутоімунні демієлінізуючі захворювання та хронічна запальна демієлінізуюча полінейропатія, діабетична нефропатія, синдром Дресслера, вогнищева алопеція, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, порушення моторики стравоходу, склеродактилія та телангіектазії), чоловіче та жіноче аутоімунне безпліддя, змішана хвороба сполучної тканини, хвороба Шага, ревматична лихоманка, повторний аборт, легені фермера, полі формна еритема, посткардіотомічний синдром, синдром Кушинга, легень птахівника, алергічний грануломатозний ангіїт, доброякісний лімфоцитарний ангіїт, синдром Альпорта, альвеоліт, такий як алергічний альвеоліт та фіброзуючий альвеоліт, інтерстиціальна хвороба легень, трансфузійна реакція, лепра, малярія, лейшманіоз, кіпаносоміоз, шистоматоз, аскаридоз, аспергільоз, синдром Самптера, синдром Каплана, лихоманка Денге, ендокардит, ендоміокардіальний фіброз, дифузний інтерстиціальний фіброз легень, фіброз легень, ідіопатичний фіброз легень, муковісцидоз, ендокриальний еритема *elevatum et diutinum*, фетальний еритробластомоз еозинофільний фасциїт, синдром Шулмана, синдром Ферті, філяріаз, циклїт, такий як хронічний циклїт, гетерохронічний циклїт, іридоциклїт (гострий або хронічний), циклїт Фуша, пурпура Шенляйн-Геноха, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), екховірусна інфекція, кардіоміопатія, хвороба Альцгеймера, парвовірусна інфекція, вірусна краснуха, поствакцинальні синдроми, природжена краснуха, вірусна інфекція Епштейна-Барра, епідемічний паротит, синдром Еванса, аутоімунний розлад гонад, хорія Сіденгама, постстрептококковий нефрит, облітеруючий тромбоангіїт, тиреотоксикоз, спинні сухоти, хоріоїдит,

гігантоклітинна поліміалгія, ендокринна офтальмопатія, хронічний гіперчутливий пневмоніт, сухий кератокон'юнктивіт, епідемічний кератокон'юнктивіт, ідіопатичний некротичний синдром, нефропатія з мінімальними змінами, доброякісне сімейне та ішемічно-реперфузійне порушення, аутоімунне пошкодження сітківки, запалення суглобів, бронхіт, хронічне обструктивне захворювання легень, сілікоз, афти, афтозний стоматит, атеросклеротичні розлади, асперміогенез, аутоімунний гемоліз, хвороба Бека, кріоглобулінемія, контрактура Дюпюитрена, факоанафілактична ендокриальна міопія, алергічний ентерит, лепротична вузлова еритема, ідіопатичний параліч обличчя, синдром хронічної втоми, ревматична лихоманка, хвороба Хаммана-Річа, сенсоневральна втрата слуху, пароксизмальна гемоглобінурія, гіпогонадизм, регіональний ілеїт, лейкопенія, інфекційний мононуклеоз, поперековий мієліт, первинна ідіопатична мікседема, нефроз, симпатична офтальмопатія, грануломатозний орхіт, панкреатит, гострий полірадікуліт, гангренозна піодермія, тиреоїдит де Куервена, набута спінальна атрофія, безпліддя, спричинене антисперматозоїдними антитілами, не злоякісна тимома, вітіліго, SCID та хвороби асоційовані з вірусом Епштейна-Барра, синдром набутого імунодефіциту (СНІД), паразитарні хвороби, такі як лейшманіоз, синдром токсичного шоку, харчове отруєння, стани, що викликають інфільтрацію Т-клітинами, недостатність адгезії лейкоцитів, імунні відповіді, асоційовані з негайною та відстроченою гіперчутливістю, медіаторами якої є цитокини та Т-лімфоцити, хвороби, що викликають діapedез лейкоцитів, синдром множинного ураження органів, хвороби, медіатором яких є комплекс антиген-антитіло, хвороба антигломерулярної базальної мембрани, алергічний неврит, аутоімунні поліендокринопатії, оофорит, первинна мікседема, аутоімунний атрофічний гастрит, симпатична офтальмія, ревматичні хвороби, змішані хвороби сполучної тканини, нефротичний синдром, інсуліт, поліендокринний розлад, периферична нейропатія, аутоімунний полігандулярний синдром Тип I, початок у дорослому віці ідіопатичного гіпаратиреоїдизму (АОІН), повна алопеція, дилатаційна кардіоміопатія, набутий бульозний епідермоліз (ЕБА), гемохроматоз, міокардит, нефротичний синдром, первинний склерозуючий холангіт, гнійний або негнійний синусит, гострий або хронічний синусит, етмоїдальний, фронтальний, максиллярний або сфеноїдальний синусити, розлади, пов'язані з еозинофілами, такі як легеневиї еозинофільний синдром, інфільтрат, еозинофільний-міалгічний синдром, синдром Лефлера, хронічна еозинофільна пневмонія, тропічна еозинофільна пневмонія, бронхоневмонічний аспергільоз, аспергільоза або еозинофільні гранульоми, анафілаксія, серонегативний спонділоартрит, аутоімунна поліендокринна хвороба, склерозуючий холангіт, склера, епісклера, хронічний слизово-шкірний кандидоз, синдром Брутона, транзитрна гіпогаммаглобулінемія у дітей, синдром Віскота-Олдрича, атаксія-телеангіектазія, аутоімунні розлади, асоційовані з коллагенозами, ревматизм, неврологічна хвороба, лімфаденіт, ішемічний реперфузійний розлад,

зниження відповіді кров'яного тиску, судинна дисфункція, ангіектазійне ураження тканин, кардіоваскулярна ішемія, гіперальгезія, алергічні гіперчутливі розлади, гломерулонефрити, реперфузійний розлад, реперфузійні ураження міокарду або інших тканин, дерматоз з гострозапальними компонентами, гострий гнійний менингіт або інші запальні захворювання центральної нервової системи, очні або орбітальні запальні захворювання, синдроми, асоційовані з трансфузією гранулоцитів, цитокін-індукована токсичність, нарколепсія, гостре серозне запалення, хронічне важкокуповане запалення, пієліт, пневмоцироз, діабетична ретинопатія, діабетичні розлади в судинах великого діаметру, ендартеріальна гіперплазія, пептична виразка, вальвуліт та ендометріоз.

"Доброякісний гіперпроліферативний розлад" означає стан пацієнта, що має відношення до клітинної проліферації та визнається ненормальним членами медичної спільноти. Ненормальний стан характеризується рівнем властивостей, який статистично відрізняється від рівня, що спостерігається в організмі, який не страждає подібним розладом. Проліферація клітин передбачає ріст або збільшення клітин шляхом розмноження та включає ділення клітин. Рівень клітинної проліферації може бути вимірний шляхом підрахунку кількості клітин, що з'являються за певний проміжок часу. Прикладами доброякісних гіперпроліферативних розладів є псоріази і поліпи.

"Респіраторна хвороба" передбачає ураження дихальної системи та включає бронхіт, астму, включаючи гостру астму та алергічну астму, муковісцидоз, бронхоектази, алергічний або інші риніти або синусити, дефіцит 1-антитрипсину, кашель, легенева емфізема, легеневий фіброз або гіперреактивність дихальних шляхів, хронічну обструктивну хворобу легень та хронічний обструктивний легеневий розлад.

"Псоріаз" - це стан, який характеризується обмеженням макулопапульозним висипанням окремих або зливних червоних зі сріблястим покриттям елементів. Псоріатичні ураження найчастіше зустрічаються на ліктях, колінах, волосистій частині голови та тулубі та мікроскопічно характеризується паракератозом та видовженням сітки гребенів. Термін включає різноманітні форми псоріазу, включаючи еритродермічний, пустулярний, середньої гостроти та важковиліковні форми хвороби.

"Ендометріоз" означає еktopічні ділянки ендометріальної тканини, які часто формують кісти, що вміщують зміщену кров.

Термін "судинна хвороба або розлад" означає різні хвороби або розлади, які впливають на судинну систему, включаючи серцево-судинну систему. Прикладами таких хвороб є атеросклероз, судинна реобструкція, постопераційний судинний стеноз, рестеноз, судинна оклюзія або каротидна обструктивна хвороба, хвороба коронарних артерій, стенокардія, хвороба дрібних судин, гіперхолестеринемія, гіпертензія та стани, що включають ненормальну проліферацію або функцію клітин епітелію.

Термін "стеноз" означає звуження або стріктуру просвіту (наприклад, протоки або каналу) в організмі.

Термін "судинний стеноз" означає оклюзію або звуження кровоносних судин. Судинний стеноз часто виникає через жирові відкладення (як у випадку атеросклерозу), або надмірну міграцію та проліферацію гладком'язевих клітин судин та ендотеліальних клітин. Артерії найбільш чутливі до стенозу. Термін "стеноз" включає первинний стеноз та рестеноз.

Термін "рестеноз" означає повернення стенозу після лікування первинного стенозу з явним успіхом. Наприклад, "рестеноз" в контексті судинного стенозу передбачає повторний випадок судинного стенозу після його успішного лікування, наприклад, видалення жирових відкладень шляхом ангіопластики (наприклад, чревшкірна чрезовірна коронарна ангіопластика), пряма коронарна атеректомія або стентування тощо. Один з факторів виникнення рестенозу - це гіперплазія інтими. Термін "гіперплазія інтими", що використовується взаємозамінно з "неоінтимальна гіперплазія" та "неоінтимальне утворення", передбачає потовщення внутрішнього шару кровоносних судин внаслідок надмірної проліферації та міграції клітин гладкої мускулатури судин та ендотеліальних клітин. Різноманітні зміни, що відбуваються під час рестенозу, часто разом призводять до "ремоделювання судинної стінки".

Терміни "балонна ангіопластика" та "чревшкірна чрезовірна коронарна ангіопластика" (PTCA) часто використовуються взаємозамінно та означають нехірургічне лікування, що базується на видаленні бляшки з коронарної артерії, використовуючи катетер. Стеноз або рестеноз часто призводять до гіпертензії як результату зростання опору току крові.

Термін "гіпертензія" означає ненормально високий артеріальний тиск, тобто вище за нормальний рівень.

Термін "поліп" означає масив тканин, що виступає назовні або вище нормального рівня поверхні і таким чином стає видимим макроскопічно у вигляді гемороїдальної сферичної або неправильної форми структури, що росте на широкій основі або тонкій ніжці. Прикладами є кишковий, ректальний та назальний поліпи.

Термін "фіброаденома" означає доброякісне новоутворення, що походить з залозистого епітелію та в якому розрізняють строму з проліферуючих фібропластів та сполучнотканинні елементи. Зазвичай трапляється в тканині грудей.

"Астма" - це стан, який проявляється в утрудненні дихання. Бронхіальна астма означає стан легень, при якому наявні численні звуження дихальних шляхів, який може спричинятися спазмом гладкої мускулатури, набряком слизової тканини або мукози в просвіті бронхів та бронхіол.

"Бронхіт" означає запалення слизової мембрани бронхів.

У цьому документі „ампула" означає контейнер з терапевтичним агентом. Ампула може бути герметично закрита кришкою, яка проколюється шприцом. Зазвичай ампули робляться зі скла. Те-

рапевтичний агент в ампулі може бути у різних станах, включаючи рідкий, ліофільний, замерзлий тощо.

"Листівка-вкладиш" - означає інструкцію, що зазвичай вкладенаються в упаковки з терапевтичними агентами і містять інформацію про показання, способи використання, дозування, призначення, протипоказання та/або попередження щодо використання таких терапевтичних продуктів.

II. Продукція антитіл

Нижче наводиться опис типової технології продукції HER-антитіл, що використовується у відповідності до даного винаходу. HER-антигеном, що використовується для продукції антитіл, може бути, наприклад, розчинна форма екстрацелюлярного домену HER або його частина, що включає бажаний епітоп. Крім того, для генерації антитіл можуть використовуватися клітини, що експресують HER на своїй клітинній поверхні (наприклад, NIH-3T3 клітини, трансформовані для надекспресії HER2; або лінія клітин карциноми, такі як SK-BR-3 клітини, дивись Stancovski et al. PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)). Інші форми HER-рецепторів, що можуть використовуватися для генерації антитіл, будуть очевидними для спеціалістів.

(i) Поліклональні антитіла

Поліклональні антитіла переважно вирощуються у тваринах, шляхом числених підшкірних (sc) або інтраперітоніальних (ip) ін'єкцій відповідного антигену та ад'юванту. Корисною може бути кон'югація відповідного антигену з протеїном, який є імуногенним у видів, що імунізуються, наприклад, гемоціанін, сироватковий альбумін, бичачий тиреоглобулін або соєвий трипсіновий інгібітор, з використанням біфункціональних або похідних агентів, наприклад, малімідобензол сульфосукциніламідний ефіру (кон'югація з залишками цистеїну), N-гідроксисукциніламід (з залишками лізину), плутаральдегіду, янтарного ангідриду, SOCI2, or R¹ N=C=NR, де R та R¹ різні алкільні групи.

Тварини імунізуються проти антигену імуногенними кон'югатами або похідними шляхом комбінування, наприклад, 100 μ г або 5 μ г білку або кон'югати (для кролів або мишей відповідно) з потрібним об'ємом повного ад'юванта Фрейнда та ін'єкцією розчину внутрішньошкірно в кількох місцях. Через місяць тваринам підвищують навантаження підшкірним введенням в кілька місць у обсязі 1/5 - 1/10 початкової кількості пептиду або кон'югати у повному ад'юванті Фрейнда. Через 7-14 днів тварині пускають кров і досліджують титр антитіл сироватки. Тваринам підвищують навантаження доки титр антитіл не виходить на плато. Тварині, переважно, збільшують навантаження кон'югатою того ж самого антигену, але кон'югованим з іншим білком та/або з іншим перехресним реагентом. Кон'югати, також, можуть бути зроблені в культурі рекомбінантних клітин шляхом злиття білків. Також, агрегацію агентів, таких як галуни доцільно використовувати для підвищення імунної відповіді.

(ii) Моноклональні антитіла

Існують різноманітні способи продукції моноклональних антитіл. Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути вироблені, використовуючи

спосіб гібридизації, вперше описаний Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), способами рекомбінації ДНК (U.S. Patent No. 4,816,567).

При способі гібридизації миша або інша придатна піддослідна тварина, така як хом'як, імунізується, описаним вище шляхом для виділення лімфоцитів, які продукують або здатні продукувати антитіла, які специфічно зв'язуватимуться з білком, який використовувався для імунізації. Крім того, лімфоцити можуть імунізуватися *in vitro*. Потім лімфоцити можуть зв'язуватися з мієломними клітинами, використовуючи придатний для цього зв'язувальний агент, такий як поліетиленгліколь, для формування гібридомних клітин (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Клітини гібридоми, приготовані таким чином, висіваються та вирощуються в придатному для цього поживному середовищі, яке, переважно, має в своєму складі одну або більше речовин, що інгібує ріст та виживання введених вихідних мієломних клітин. Наприклад, якщо у вихідних мієломних клітинах недостатньо ферменту гіпоксантингуанінфосфорібозилтрансферази (HGPRT або HPRT), поживне середовище для гібридоми буде мати в своєму складі гіпоксантин, аміноптерин та тимідин (HAT-середовище), речовини яких будуть попереджувати ріст клітин з недостатністю HGPRT.

Бажані мієломні клітини - це ті, що ефективно зв'язуються, підтримують стабільно високий рівень продукції антитіл, підібрані шляхом відбору антитіло-продукуючих клітин та чутливі до таких середовищ як HAT-середовище. Серед них перевага надається мишачим мієломним лініям, таким як похідні MOPC-21 та MPC-11 мишачі пухлини, що поставляються Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, та SP-2 або X63-Ag8-653 клітини, що поставляються American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Також були описані для продукування людських моноклональних антитіл лінії клітин людської мієломи та мишачо-людської гетеромієломи (Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984); та Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Поживні середовища, в яких клітини гібридоми ростуть, досліджуються на предмет продукції моноклональних антитіл, спрямованих проти антигену. Переважно,

специфічне зв'язування моноклональних антитіл, які продукуються клітинами гібрид оми визначається імунопреципітацією або дослідженням зв'язування *in vitro*, таким як радіоімунне дослідження (RIA) або ферментозв'язувальним імуноабсорбентним дослідженням (ELISA).

Зв'язувальна спорідненість моноклонального антитіла може, наприклад, визначатися шляхом Scatchard аналізу, описаного у Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Після ідентифікації гібридомних клітин, як таких, що продукують антитіла бажаної специфічності, спорідненості та/або активності, клони можуть бути субклоновані шляхом обмеженої кількості

процедур розведення та вирощуватися стандартними способами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Придатні для цього поживні середовища включають, наприклад, D-MEM або RPMI-1640-середовища. Крім того, гібридомні клітини можуть бути вирощені *in vivo* як асцитичні пухлини у тварин.

Моноклональні антитіла, секретовані субклонами, зручно відділяються від поживного середовища, асцитичної рідини або сироватки методами стандартної очистки антитіл, такими як, наприклад, білок A-Sepharose, гідроксілапатитна хроматографія, електрофорез у гелі, діаліз, або афінна хроматографія.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, легко ізолюються та використовуються з використанням стандартних процедур (наприклад, використовуючи олігонуклеотидні проби, які сприяють специфічному зв'язуванню з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги мишачих антитіл). Клітини гібридоми слугують найкращим джерелом такої ДНК. Ізольована таким чином ДНК може бути розміщена у векторах експресії, які потім трансфектуються у клітини-реципієнти такі, як клітини *E. coli*, мавпячі COS-клітини, клітини яєчників китайського хом'яка (CHO) або мієломні клітини, які інакше не продукують білки антитіл, для отримання синтезу моноклональних антитіл в рекомбінантних клітинах-реципієнтах. Перелік статей щодо рекомбінантної експресії ДНК, що кодують антитіла у бактерій, включають Skerra et al., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5:256-262 (1993) та Plickthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

Як один з варіантів здійснення винаходу, моноклональні антитіла або фрагменти антитіл можуть бути ізольованими від фагових бібліотек антитіла, генерованих за технологією, описаною у McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) та Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) описують ізоляцію мишачих та людських антитіл відповідно, використовуючи фагові бібліотеки. Наступні публікації описують продукцію людських антитіл з високою спорідненістю (nM рівень) шляхом перетасування ланцюгів (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), та комбінаторним інфікуванням, та рекомбінацією *in vivo* як стратегію створення дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким чином, ці технології є конкурентоздатною альтернативою для традиційної технології гібридомі моноклональних антитіл для ізоляції моноклональних антитіл.

ДНК може бути модифікована, наприклад, шляхом заміни кодуєчої послідовності для константних доменів людських важких і легких ланцюгів в місці гомологічної мишачої послідовності (U.S. Patent No. 4,816,567; та Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), або шляхом ковалентного приєднання до імуноглобулінокодуєчої послідовності всієї або частини кодуєчої послідовності не імуноглобулінового поліпептиду.

Зазвичай такі не імуноглобулінові поліпептиди заміщуються константними доменами антитіл або

варіабельними доменами одного антиген-комбінуючого сайту антитіла для створення химерного бівалентного антитіла, що має в своєму складі один антиген-комбінуючий сайт, який є специфічним для різних антигенів.

(iii) Гуманізовані антитіла

У літературі описані способи гуманізації не-людських антитіл. Переважно, гуманізовані антитіла мають один або більше амінокислотний залишок, введений в них з нелюдського джерела. Такі нелюдські амінокислотні залишки часто називаються „імпортованими“ залишками, які зазвичай взяті з „імпортованого“ варіабельного домену. Гуманізація може бути проведена за методикою Winter та співавторів (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), шляхом заміни гіперваріабельної ділянки послідовності на відповідну послідовність людського антитіла. Таким чином, такі „гуманізовані“ антитіла є химерними антитілами (U.S. Patent No. 4,816,567), в яких значно менше, ніж інтактний людський варіабельний домен, було замінено відповідною послідовністю, взятою від нелюдського виду. На практиці гуманізовані антитіла - це типово людські антитіла, в яких деяка гіперваріабельна ділянка залишків та, можливо, FR-залишки замінені залишками аналогічних сайтів антитіл гризунів.

Вибір людських варіабельних доменів, як легких, так і важких, які використовуються у виробленні гуманізованих антитіл, дуже важливий для зменшення антигенності. Відповідно до так званого методу "найкращої відповідності", послідовність варіабельного домену антитіла гризуна захищується від усієї бібліотеки відомих людських варіабельно-доменних послідовностей. Людська послідовність, яка є найближчою до такої ж у гризунів, приймається за людську матричну ділянку (FR) для гуманізованого антитіла (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Інший спосіб використовує окрему матричну ділянку, що походить з єдиної послідовності всіх людських антитіл окремої підгрупи легких або важких ланцюгів. Одну і ту ж матрицю можна використовувати для кількох різних гуманізованих антитіл (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Крім того, важливо щоб гуманізація антитіл проводилася з дотриманням високої спорідненості до антигену та інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення даної мети, відповідно до обраного способу, гуманізовані антитіла готуються шляхом аналізування вихідних послідовностей та різноманітних концептуальних гуманізованих продуктів, використовуючи тривимірні моделі вихідної та гуманізованої послідовності. Тривимірні моделі імуноглобулінів зазвичай доступні та знайомі для спеціалістів. Існують комп'ютерні програми, які ілюструють та показують можливі тривимірні конформаційні структури обраної послідовності імуноглобуліну. Огляд цих зображень дозволяє аналізувати ймовірну роль залишків у функціонуванні обраної імуноглобулінової послідовності, тобто аналіз залишків, які впливають на

здатність обраного імуноглобуліну зв'язуватися з його антигеном. Таким чином, FR-залишки можуть обиратися та комбінуватися між реципієнтними та імпортними послідовностями, так, як це необхідно для характеристик антитіл, таких, як досягання зростання спорідненості до антигену-мішені. Взагалі, залишки гіперваріабельних ділянок суттєво та прямо впливають на зв'язування антигену.

WO 01/00245 описує продукцію екземплярів гуманізованих антитіл до HER2, які зв'язують HER2 та блокують активацію ліганд HER-рецептора. Гуманізовані антитіла, що розглядаються в цьому документі, блокують EGF, TGF- α та/або HRG-медіовану активацію MAPK так само ефективно, як мишачі моноклональні антитіла 2C4 (або їхні Fab-фрагменти) та/або зв'язують HER2 так само ефективно, як мишині моноклональні антитіла 2C4 (або їхні Fab-фрагменти). Гуманізовані антитіла можуть, наприклад, мати в своєму складі залишки нелюдської гіперваріабельної ділянки, вбудовані у людський варіабельний важкий домен, а також можуть включати в себе матричну ділянку (FR), замінену на позиції, що обрана з групи, яка складається з 69H, 71H та 73H, використовуючи систему нумерації варіабельних доменів, прийняту у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Іноді гуманізоване антитіло має у своєму складі заміни FR у двох або всіх позиціях 69H, 71H та 73H.

Типове гуманізоване антитіло, що розглядається тут, має в своєму складі варіабельний важкий домен гіперваріабельної ділянки залишку GFTFTDYTMX, де X є переважно D або S (SEQ ID NO:7); DVNPNSSGGSINQRFKG (SEQ ID NO:8); та/або NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), факультативно включає в себе амінокислотні модифікації цих CDR-залишків, наприклад, де модифікації в основному підтримують або покращують аффіність антитіла. Наприклад, варіант антитіла, що розглядається тут, може мати від близько одного до близько семи або близько п'яти амінокислотних заміщень в зазначених вище варіабельних важких CDR-послідовностях. Такі варіанти антитіл можуть готуватися шляхом аффінного дозрівання, наприклад, як описано нижче. Найбажаніше гуманізоване антитіло має в своєму складі варіабельний важкий домен амінокислотної послідовності у SEQ ID NO:4.

Гуманізоване антитіло може мати у своєму складі варіабельний легкий домен гіперваріабельної ділянки залишку KASQDVSIQVA (SEQ ID NO:10); SASYXX¹X²X³, де X¹ є переважно R або L, X² є переважно Y або E, та X³ є переважно T або S (SEQ ID NO:11); та/або QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12), наприклад, додатково до цих варіабельних важких доменів CDR-залишків у попередньому параграфі. Такі гуманізовані антитіла, як варіант, можуть мати у своєму складі амінокислотні модифікації зазначених вище CDR-залишків, наприклад, де модифікації в основному підтримують або покращують аффіність антитіла. Наприклад, варіант антитіла, який розглядається тут, може мати від близько одного до близько семи або п'яти аміно-

кислотних заміщень в зазначених вище варіабельних легких CDR послідовностях. Такі варіанти антитіл можуть готуватися шляхом аффінного дозрівання, наприклад, як описано нижче. Найбажаніше гуманізоване антитіло має в своєму складі варіабельний легкий домен амінокислотної послідовності у SEQ ID NO:3.

Ця заявка розглядає аффіне дозрівання антитіл, які зв'язують HER2 та блокують активацію ліганд HER-рецептора. Вихідні антитіла можуть бути людськими або гуманізованими, наприклад, можуть мати в своєму складі варіабельну легку та/або важку послідовність SEQ ID Nos. 3 та 4, відповідно (тобто варіант 574). Аффінно зріле антитіло переважно приєднується до HER2-рецептора з аффіністю, вищою за мишачий 2C4 або варіант 574 (наприклад, від двох або чотирьох разів до 100 разів або 1000 разів покращеною аффіністю, наприклад, як досліджено при використанні HER2-екстрацелюлярного домену (ECD) ELISA). Типові варіабельні важкі CDR-залишки для заміни включають H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99, або комбінації двох або більше (наприклад, два, три, чотири, п'ять, шість або сім таких залишків). Приклади варіабельних легких CDR залишків для альтерації включають L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 або комбінації двох або більше (наприклад, два, три, чотири, п'ять, або до десяти таких залишків).

Передбачаються різноманітні форми гуманізованих антитіл або аффіно зрілих антитіл. Наприклад, гуманізоване антитіло або аффіно зріле антитіло може бути фрагментом антитіла, таким як Fab, який довільно кон'югується з одним або більше цитотоксичним агентом в такому порядку, щоб генерувати імунокон'югату. Крім того, гуманізоване антитіло або аффіно зріле антитіло може бути інтактним антитілом, таким як інтактне IgG1-антитіло. Бажане інтактне IgG1-антитіло має в своєму складі легколанцюгову послідовність у SEQ ID NO: 13 та важколанцюгову послідовність у SEQ ID NO: 14.

(iv) Людські антитіла

Як альтернатива гуманізації можуть генеруватися людські антитіла. Наприклад, зараз можливо відтворювати трансгенних тварин (наприклад, мишей), які здатні, при імунізації, створювати повний репертуар людських антитіл при відсутності ендогенної продукції імуноглобулінів. Наприклад, було описано, що гомозиготна делеція гена важколанцюгової з'єднувальної ділянки антитіла (J_H) в химерній та зародковій мутантній миші призводить до повного пригнічення ендогенної продукції антитіл. Пасаж генного масиву людського зародкового імуноглобуліну в такий зародок миші призводить до продукції людських антитіл у відповідь на введення антигену. Дивись, наприклад, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bragghermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); та U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 та 5,545,807.

Як альтернатива, для продукції людських антитіл та антитільних фрагментів *in vitro* з імуноглобулінового варіабельного (V) домену генного репертуару неімунізованих донорів може

використовуватися технологія фагової індикації (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)). Відповідно до цієї технології, гени антитіл V домену клонуються у матриці в гени більших або менших поверхневих білків ниткоподібного бактеріофагу, такого як M13 або fd, та проявляються як функціональні антитільні фрагменти на поверхні фагової частинки. Через те, що ниткоподібні частинки мають в своєму складі односпіральну ДНК-копію геному фагу, селекції, що базуються на функціональних властивостях антитіла, також викликають селекцію генів, що кодують виявлення антигенами цих властивостей. Таким чином, фаг мімікрує деякі властивості В-клітини. Фагова індикація може проводитись у кількох форматах, для детальнішої інформації про них дивись, наприклад, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Деякі джерела сегментів V-гену можуть використовуватися для фагової індикації. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) виділяють різні масиви антиоксидантних антитіл з маленької довільної комбінаторної бібліотеки V-генів з селезінки імунізованої миші. Репертуар V-генів від неімунізованих людських донорів може бути сформований та антитіла до різних масивів антигенів (включаючи власні антигени) можуть бути ізолювані переважно за технологією, описаною Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) або Griffith et al., EMBOJ. 12:725-734 (1993). Дивись також U.S. Patent Nos. 5,565,332 та 5,573,905.

Як зазначено вище, людські антитіла також можуть генеруватися активованими *in vitro* В-клітинами (див. U.S. Patents 5,567,610 та 5,229,275).

Людські HEK2-антитіла описані у U.S. Patent No. 5,772,997, виданому 30 червня 1998р. та WO 97/00271, опублікованому 3 січня 1997р

(v) Фрагменти антитіл

Було розроблено різноманітні технології для продукції фрагментів антитіл, які мають в своєму складі одну або більше антиген-зв'язуючі ділянки. Зазвичай ці фрагменти були похідними протеолітичного травлення інтактних антитіл (дивись, наприклад, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) та Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однак, зараз ці фрагменти можуть продукуватися прямо рекомбінантними клітинами-реципієнтами. Наприклад, фрагменти антитіл можуть ізолюватися від фагових бібліотек антитіл як зазначено вище. Як альтернатива, Fab'-SH фрагменти можуть прямо отримуватися від E. coli та хімічно з'єднуватися для формування F(ab')₂-фрагментів (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Відповідно до іншого підходу, F(ab')₂ фрагменти можуть ізолюватися безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-реципієнтів. Інші технології продукування фрагментів антитіл зрозумілі обізнаному практику. За іншими варіантами здійснення винаходу, обирається антитіло, яке є одноланцюговим Fv-фрагментом (scFv). Дивись WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894 та U.S. Patent No. 5,587,458. Фрагмент антитіла також може бути „лінійним антитілом“, наприклад, як описано у U.S. Patent

5,641,870. Такі фрагменти лінійних антитіл можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

(vi) Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла - це антитіла, які мають зв'язувальні властивості, принаймні для двох різних епітопів. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть приєднуватися до двох різних епітопів HER2 протеїну. Інші подібні антитіла можуть створювати HER2-зв'язувальний сайт зі зв'язувальним сайтом (сайтами) для EGFR, HER3 та/або HER4. Як альтернатива, HEK2-плече може комбінуватися з плечем, яке приєднується до тригерної молекули на лейкоциті, такої як молекула Т-клітинного рецептора (наприклад, CD2 або CD3), або Fc-рецептори до IgG (FcγR), такі як FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) та FcγRIII (CD 16) для того, щоб сфокусувати механізм захисту клітин на HER2-експресуючих клітинах. Біспецифічні антитіла також можуть використовуватися для локалізації цитотоксичних агентів до клітин, які експресують HER2. Ці антитіла мають HER2-зв'язуюче плече та плече, яке зв'язує цитотоксичний агент (наприклад, сапорин, антиінтерферон-α, алкалоїд барвінку, рицин-А-ланцюг, метотрексат або гаптен з радіоактивним ізотопом). Біспецифічні антитіла можуть готуватися як повнорозмірні антитіла або фрагменти антитіл (наприклад, F(ab')₂ біспецифічні антитіла).

WO 96/16673 описує біспецифічне HER2/FcγRIII антитіло, а U.S. Patent No. 5,837,234 розкриває біспецифічне HER2/FcγRI антитіло ШМ1 (Osidem). Біспецифічне HER2/Fcα антитіло показане у WO 98/02463. U.S. Patent No. 5,821,337 описує біспецифічне HER2/CD3 антитіло. MDX-210 - це біспецифічне HER2- FcγRIII Ab.

Відомі способи вироблення біспецифічних антитіл. Традиційна продукція повнорозмірних біспецифічних антитіл базується на ко-експресії двох пар важколегколанцюгових імуноглобулінів, де два ланцюги мають різні специфікації (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Через довільний набір важких і легких ланцюгів імуноглобулінів такі гібридами (квадроми) продукують потенційну суміш з десяти різних молекул антитіл, з яких тільки одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке зазвичай робиться афінно-хроматографічним способом, достатньо незручне та продуктивність його низька. Схожі процедури описані у WO 93/08829, та у Trautner et al., EMBOJ., 10:3655-3659(1991).

Відповідно до іншого підходу, варіабельні домени антитіл з бажаними зв'язуючими властивостями (антитіло-антиген комбінуючі сайти) приєднуються до послідовностей константного домену імуноглобуліну. Перевага надається приєднанню до константного домену важкого ланцюга імуноглобуліну, що має в своєму складі принаймні частину шарніру, CH2, та CH3 регіони. Перевага надається першій важколанцюговій константній ділянці (CH1), що має в своєму складі сайт, необхідний для приєднання легкого ланцюга, присутнього в принаймні одному з'єднанні. ДНК, що кодує з'єднання важкого ланцюга імуноглобуліну, та, якщо необхідно, легкого ланцюга імуноглобуліну вставляються в окремі вектори експресії та ко-

трансфектуються в придатний для цього організм реципієнта. Це забезпечує велику гнучкість в регулюванні взаємних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів у варіантах здійснення, коли не рівні коефіцієнти трьох поліпептидних ланцюгів, що використовуються в конструкції, що забезпечує оптимальну продуктивність. При цьому існує можливість помістити кодуєчі послідовності для двох або всіх трьох ланцюгів поліпептидів в один вектор експресії, коли експресія принаймні двох поліпептидних ланцюгів в рівних пропорціях призводить до високої продуктивності або коли співвідношення не має особливого значення.

Відповідно до бажаного варіанту здійснення цього підходу, біспецифічні антитіла складаються з гібридних важких ланцюгів імуноглобуліну з першим зв'язувальним сайтом на одному плечі та гібридною парою важкий-легкий ланцюг імуноглобуліну (забезпечує другий зв'язувальний сайт) на іншому плечі. Було виявлено, що ця асиметрична структура дає можливість сепарації бажаної біспецифічної суміші від небажаних комбінацій ланцюгів імуноглобуліну, таких як присутність легкого ланцюгу імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули, яка забезпечує можливість сепарації. Цей підхід розкривається у WO 94/04690. Для більш детальної інформації про генерування біспецифічних антитіл дивись, наприклад, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210(1986).

Відповідно до іншого підходу, що описано у U.S. Patent No. 5,731,168, інтерфейс між парою антитільних молекул може бути створений для максимізації проценту гетеродимерів, які походять з культури рекомбінантних клітин. Найкращий інтерфейс має в своєму складі принаймні частину C_H3-домену константного домену антитіла. В цьому способі одна або більше маленьких амінокислот бічних ланцюгів інтерфейсу молекули першого антитіла заміщена більшим бічним ланцюгом (наприклад, тирозином або триптофаном). Компенсаторні „порожнини” ідентичного або схожого розміру з великим бічним ланцюгом (ланцюгами) створюються на інтерфейсі другої молекули антитіла заміщенням великої амінокислоти бічного ланцюга на меншу (наприклад, аланіном або треоніном). Це забезпечує механізм зростання продукції гетеродимерів більше інших небажаних кінцевих продуктів, таких як гомодимери.

Біспецифічні антитіла включають зшиті або "гетерокон'юговані" антитіла. Наприклад, одне з таких антитіл в гетерокон'югаті може бути зв'язане з авідіном, інше з біотіном. Такі антитіла, наприклад, пропонувалися для націлення клітин імунної системи на небажані клітини (U.S. Patent No. 4,676,980), та для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 та EP 03089). Гетерокон'юговані антитіла можуть бути створені з використанням будь-якого зручного зшивального способу. Придатні для цього зшиваючі агенти добре відомі та описані у U.S. Patent No. 4,676,980, наряду з іншими зшиваючими технологіями.

Технології генерації біспецифічних антитіл з антитільних фрагментів також були описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть

бути створені, використовуючи хімічну зшивку. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) описують процедуру, при якій інтактні антитіла протеолітично розщеплюються для генерації P(ab')₂-фрагментів. Ці фрагменти зменшуються у присутності дітіол-комплесуючого агента карбонату арсену для стабілізації кристалів дітіолу та попередження інтермолекулярної дисульфідної формації. Згенеровані Fab'-фрагменти потім конвертуються у похідні тіонітробензоату (TNB). Одна з похідних Fab'-TNB потім реконвертується у Fab'-тіол шляхом редукції з меркаптоетиламіном та змішується з рівномолекулярною кількістю іншої похідної Fab'-TNB для формування біспецифічного антитіла. Вироблене біспецифічне антитіло може використовуватися як агент для селективної іммобілізації ферментів.

Сучасний розвиток зробив можливим пряме виділення Fab'-SH фрагментів з *E. coli*, які можуть хімічно з'єднуватися для формування біспецифічних антитіл. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) описують продукцію P(ab')₂-молекули повністю гуманізованого біспецифічного антитіла. Кожен Fab'-фрагмент був окремо секретований з *E. coli* та підданий прямій хімічній з'єднувальній реакції *in vitro* для формування біспецифічного антитіла. Сформоване таким чином біспецифічне антитіло було здатне до приєднання до клітин з надекспресією HER2-рецептору та нормальних людських Т-клітин, так само, як і тригерів літичної активності людських цитотоксичних лімфоцитів проти людської пухлини грудей.

Також були описані різноманітні технології вироблення та ізоляції біспецифічних антитільних фрагментів прямо у культурі рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла були продуктовані з використанням лейцинової „блискавки". Kostelny et al. *J. Immunol*, 148(5): 1547-1553 (1992). Пептиди лейцинової „блискавки" з Fos та Jun білків були зчеплені з Fab'-частинами двох різних антитіл шляхом генного злиття. Гомодимери антитіл були зменшені у шарнірній області для формування мономерів і подальшого окиснення для формування гетеродимерів антитіл. Цей спосіб може також використовуватися для продукції гомодимерів антитіл. Технологія „димерних фрагментів антитіл", описана у Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), забезпечила альтернативний механізм вироблення фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти мають у своєму складі варіабельний домен важкого ланцюга (V_H), з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (V_L) за допомогою зшивача, який є закоротким для того, щоб дозволити кон'югацію між двома доменами одного ланцюга. Відповідно, V_H та V_L домени одного фрагменту змушені паруватися з комплементарними V_L та V_H доменами іншого фрагменту, таким чином, формуючи антиген-зв'язуючі сайти. Також відомо про іншу методику вироблення біспецифічних фрагментів антитіл за допомогою о дно ланцюгових Fv (sFv) димерів. Дивись Graber et al., *J. Immunol*, 152:5368 (1994).

Розглядаються також антитіла з більше ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути

створені трьохвалентні антитіла. Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991).

(vii) Інші модифікації амінокислотної послідовності

Береться до уваги модифікація (модифікації) амінокислотної послідовності антитіл, розглянута вище. Наприклад, бажаним може бути покращення зв'язувальності спорідненості та/або інших біологічних функцій антитіл. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла створюються шляхом введення відповідних нуклеотидних змін в нуклеїнову кислоту антитіла або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції з та/або вставки в, та/або заміни залишків амінокислотними послідовностями антитіла. Будь-яку комбінацію делеції, вставлення та заміни роблять для досягнення фінальної конструкції, за умови, що фінальна конструкція має бажані характеристики. Амінокислотні зміни можуть також змінювати пост-трансляційні процеси антитіла, такі як зміна числа або позицій глікозильованих сайтів.

Корисний метод ідентифікації певних залишків або ділянок антитіла, які є найкращими місцями для мутагенезу називається „аланін скануючий мутагенез“, як це описано у Crniningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989). Залишок або група залишків-мішеней ідентифікуються (наприклад, заряджені залишки, такі як arg, asp, Ms, lys, та glu) та переміщуються нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (найкраще аланіном або поліаланіном) для ураження зв'язку амінокислот з антигеном. Такі амінокислотні локуси, що демонструють функціональну чутливість до заміни, потім очищуються шляхом введення подальших або інших варіантів у чи для сайтів заміни. Таким чином, якщо сайт для введення варіанту амінокислотної послідовності предетермінований, характер мутації за своєю суттю не повинен бути предетермінований. Наприклад, для аналізу ефектів мутації даного сайту проводиться ала-сканування або довільний мутагенез в об'єктному кодоні або ділянці, та експресовані варіанти антитіла досліджуються на наявність бажаної активності.

Вставки амінокислотних послідовностей включають аміно- та/або карбокси-кінцеві з'єднання, ранговані за довжиною з одного залишку до поліпептиду, що має в своєму складі сто або більше залишків та вставки окремих або множинних амінокислотних залишків всередині послідовності. Прикладами кінцевих вставок є антитіло з N-кінцевим метіоніновим залишком або антитіло, зв'язане з цитотоксичним поліпептидом. Інші вставні варіанти молекули антитіла включають приєднання N- або C-кінцевих антитіл до ферментів (наприклад, до ADEPT) або поліпептид, який збільшує період напіврозпаду антитіла у сироватці.

Інший тип варіанту - заміщений амінокислотний варіант. Ці варіанти мають принаймні один амінокислотний залишок в молекулі антитіла заміщений іншим залишком. Сайти, які викликають найбільше зацікавлення у зв'язку з замінним мутагенезом, включають гіперваріабельні ділянки, але також розглядаються FR-альтерації. Консервативні заміни показані у Таблиці 1 під назвою "бажані

зміни". Якщо такі заміни призводять до зміні біологічної активності, тоді більш суттєві зміни, що зазначено як "типіві зміни" у Таблиці 1 або більш повно описано нижче у поясненні до амінокислотних класів, можуть бути представлені, а відповідні продукти - досліджені.

Таблиця 1

| Вихідний залишок | Типові зміни | Бажані зміни |
|------------------|-------------------------------------|--------------|
| 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 |
| Glv (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg | Arg |
| He (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine | Leu |
| Leu (L) | Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe | He |
| 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) | He; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine | Leu |

Суттєві модифікації у біологічних властивостях антитіла досягаються шляхом селекції змін, які значно відрізняються у їхньому впливі на підтримання (а) структури поліпептидного скелету у місці заміщення, такої як, наприклад, листової або спіральної структури; (b), заряду або гідрофобності молекули у сайті-мішені, або (c) об'єму бічного ланцюга. Амінокислоти можуть групуватися за схожістю властивостей їхніх бічних ланцюгів (у A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) наступним чином:

(1) неполярні: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) з незарядженою полярністю: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Тут (Y), Asn (N), Gln(Q)

(3) кислотні: Asp (D), Glu (E)

(4) базисні: Lys (K), Arg (R), His(H)

Крім того, залишки, які трапляються у природі, можуть бути розподілені на групи на основі спільних властивостей бічних ланцюгів:

(1) гідрофобні: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) acidic: Asp, Glu;

(4) базисні: His, Lys, Arg;

(5) залишки, які впливають на орієнтацію: Gly, Pro;

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни призведуть до зміни члену одного з цих класів на інший клас.

Будь-який цистеїновий залишок, що не відповідає за підтримання потрібної структури антитіла, також може бути замінений, частіше за все серином - для покращення окисної стабільності молекули та попередження абберантного перехресного зшивання. І навпаки, цистеїновий зв'язок (зв'язки) може додаватися до антитіла для покращення його стабільності (зокрема, там де антитіло - це антитільний фрагмент, такий як Fv-фрагмент).

Найбажаніший тип замінного варіанту передбачає заміну однієї або більше гіперваріабельних ділянок залишків вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Загалом, отриманий варіант(и), обраний для подальшого розвитку, покращує біологічні властивості вихідного антитіла, з якого вони генерувалися. Придатний для цього шлях генерування таких замінних варіантів включає афінне дозрівання з використанням фагової індикації. Коротше кажучи, кілька сайтів гіперваріабельних ділянок (наприклад, сайти 6-7) піддаються мутації для генерації всіх можливих аміних заміщень в кожному сайті. Варіанти антитіл, генеровані таким чином, індуються у моновалентному вигляді з частинкою ниткоподібного фага як зв'язки з геном ПІ продуктом M13, що укомплектований з кожною частинкою. Фаг-індикувані варіанти потім досліджуються на предмет біологічної активності (наприклад, зв'язувальної спорідненості). З метою ідентифікації гіперваріабельних ділянок сайтів, що є кандидатами для модифікації, може проводитися аланінскануючий мутагенез для ідентифікації гіперваріабельних ділянок залишків, які значно впливають на зв'язування антигену. Як альтернатива або додатково може бути корисно провести аналіз кристалічної структури комплексу антиген-антитіло для ідентифікації контактних точок між антитілом та людським HER2. Такі контактні залишки та суміжні залишки є кандидатами для заміни відповідно до технологій ретельно викладених вище. Якщо такі варіанти генеруються, варіантна панель підлягає описаному вище скринінгу та антитіла з кращими властивостями, показаними в одному або більше дослідженні, можуть обиратися для наступного розвитку.

Інший тип амінокислотного варіанту антитіла змінює оригінальну глікозильовану структуру антитіла. Під зміною мається на увазі видалення одного або більше вуглеводних фрагментів, знайдених у антитілі та/або додавання одного або більше сайтів глікозиляції, яких немає в антитілі.

Глікозиляція антитіл зазвичай буває N-зв'язаною або O-зв'язаною. N-зв'язана - передбачає приєднання вуглеводу до бічного ланцюга аспаргінового залишку. Трипептидні послідовності аспаргін-X-серин та аспаргін-X-треонін, де X - це будь-яка амінокислота, крім проліну, є послідовностями, які розпізнаються для ферментного приєднання вуглеводу до аспаргінової частини ланцюга. Таким чином, присутність кожної з цих трипептидних послідовностей створює потенційний сайт глікозиляції. O-зв'язана глікозиляція передбачає приєднання одного з цукрів N-ацетилгалактозаміну, галактози або ксилози до

гідроксиамінової кислоти, найчастіше серину або треоніну, хоча також може використовуватись 5-гідроксипролін або 5-гідроксилізін.

Додавання сайтів глікозиляції до антитіла значною мірою досягається зміною амінокислотної послідовності, такої як та, що має у своєму складі одну або більше з описаних вище трипептидних послідовностей (для N-зв'язаних сайтів глікозиляції). Зміни також можуть завдаватися шляхом додавання до або заміни одного або більше серинового або треонінового залишку у послідовності вихідного антитіла (для O-зв'язаних сайтів глікозиляції).

Якщо антитіло має у своєму складі Fc-ділянку, прикріплений до нього вуглевод може бути змінений. Наприклад, антитіла зі стабільною вуглеводною структурою та нестачею фукози, прикріпленої до Fc-ділянки антитіла, описані у US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L. Дивись також US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитіла з половиною N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc) в прикріпленому до Fc-ділянки антитіла вуглеводі описані у WO 03/011878, Jean-Mairet et al. та US Patent No. 6,602,684, Umana et al. Антитіла з принаймні одним галактозним залишком в прикріпленому до Fc-ділянки антитіла олігосахариді описані у WO 97/30087, Patel et al. Дивись також WO98/58964 (Raju, S.) та WO 99/22764 (Raju, S.) стосовно антитіл зі зміненим вуглеводом, прикріпленим до їх Fc-ділянки.

Може бути доцільним модифікувати антитіло винаходу стосовно ефекторної функції, наприклад, таким чином, щоб посилити антиген-залежну клітинно-медійовану цитотоксичність (ADCC) та/або комплемент-залежну цитотоксичність антитіла (CDC). Це може бути досягнуто введенням однієї або більше амінокислотних заміни до Fc-ділянки антитіла. Як альтернатива або додатково, до Fc-ділянки може бути введений цистеїновий залишок (залишки), дозволяючи таким чином формування дисульфідного зв'язку в цій ділянці. Гомодимерне антитіло, згенероване таким чином, може покращувати здатність до інтерналізації та/або підвищення комплемент-медійованого знищення клітин та антиген-залежно клітинно-медійовану цитотоксичність (ADCC). Дивись Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) та Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерні антитіла з покращеною антипухлинною активністю також можна готувати, використовуючи гетеробіфункціональні перехресні зшивачі, як описано у Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Як альтернатива, може бути створене антитіло, яке має подвійну Fc-ділянку та покращений таким чином комплементний лізіс та ADCC-можливості. Дивись Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

WO 00/42072 (Presta, L.) описує антитіла з покращеною ADCC-функцією у присутності людських ефекторних клітин, де антитіла мають у своєму складі амінокислотні заміни у їх Fc-ділянці. Перевага надається антитілу з покращеною ADCC, що має у своєму складі заміни на позиціях 298, 333 та/або 334 Fc-ділянки. Перевага надається зміненій Fc-ділянці людського IgG1, Fc-ділянка якого має

у своєму складі заміни на одній, двох або трьох таких позиціях.

Антитіла зі зміненим C1q-зв'язуванням та/або комплемент-залежною цитотоксичністю (CDC) описані у WO 99/51642, US Patent No. 6,194,551B1, US Patent No. 6,242,195B1, US Patent No. 6,528,624B1 та US Patent No. 6,538,124 (Idusogie et al.). Антитіла мають у своєму складі амінокислотні заміни на одній або більше амінокислотній позиції 270, 322, 326, 327, 329, 313, 333 та/або 334 їх Fc-ділянки.

Для збільшення сироваткового напівперіоду життя антитіла можна включати рецептор реутилізації зв'язувального епітопу в антитіло, (особливо в антитільний фрагмент) як описано, наприклад, у US Patent 5,739,277. Термін "рецептор реутилізації зв'язувального епітопу" використовується тут для позначення епітопу Fc-ділянки молекули IgG (наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, або IgG₄), які відповідають за збільшення сироваткового напівперіоду життя молекули IgG in vivo. Антитіла з покращеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), та збільшеними напівперіодами життя описані у WO 00/42072 (Presta, L.). Такі антитіла мають у своєму складі Fc-ділянку з однією або більше заміною, які покращують зв'язування Fc-ділянки з FcRn. Наприклад, Fc-ділянка може мати заміни на одній або більше позиціях 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434. Перевага надається варіанту антитіла з Fc-ділянкою з покращеним FcRn-зв'язуванням, яке має у своєму складі амінокислотні заміни на одній, двох або трьох позиціях 307, 380 та 434 Fc-ділянки.

Також розглядаються створені антитіла з трьома або більше (найкраще з чотирма) функціональними антиген-зв'язувальними сайтами (US Appl No. US 2002/0004587 A1, Miller et al.).

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіанти амінокислотної послідовності антитіла, готують різноманітними відомими способами. Ці способи включають, але не обмежуються цим, ізоляцію від природного джерела (у випадку варіантів амінокислотної послідовності, які зустрічаються у природі) або приготування шляхом олігонуклеотид-медійованого (або сайт-спрямованого) мутагенезу, ПЛР-мутагенезу, та касетного мутагенезу раніше підготованих варіантів або неваріантної версії антитіла.

(viii) Скринінг антитіл з бажаними властивостями

Технології генерації антитіл були описані вище. Антитіла можуть обиратися за певними біологічними характеристиками, які є бажаними.

Для ідентифікації антитіла, яке блокує ліганду активації HER-рецептора, може визначатися можливість антитіла до блокування HER-ліганди, яка приєднується до клітин, що експресують HER-рецептор (наприклад, при кон'югації з іншим HER-рецептором, з яким відповідний HER-рецептор формує HER-гетероолігомер). Наприклад, клітини, які природньо експресують або трансфектовані до експресування HER-рецепторів HER-гетероолігомеру, можуть бути інкубовані з антитілом, а потім піддані впливу міченої HER-ліганди.

Здатність антитіла блокувати приєднання ліганди до HER-рецептора в HER-гетероолігомері може бути оцінена.

Наприклад, пригнічення приєднання HRG до MCP7-лінії клітин пухлини грудей HER2-антитілами може проводитись, використовуючи моношар MCF7 культур на льоду у 24-чарунковій тарілці, як описано у WO 01/00245. HER2-моноклональні антитіла можуть додаватися до кожної чарунки та інкубуватися 30 хвилин. І-мічені rHRGβ1¹⁷⁷⁻²²⁴ (25 pM) можуть потім додаватися та інкубація може продовжуватися на 4-16 годин. Крива доза-відповідь може готуватися та IC₅₀ об'єм може підраховуватися для антитіла, яке представляє інтерес. За одним з варіантів здійснення винаходу, антитіло, яке блокує ліганду активації HER-рецептора буде мати IC₅₀ для пригнічення приєднання HRG до MCF7-клітин, в цьому дослідженні приблизно 50nM або менше, а краще 10nM або менше. Там, де антитіло є антитільним фрагментом, таким як Fab-фрагмент, IC₅₀ для пригнічення приєднання HRG до MCP7-клітин може, наприклад, бути приблизно 100nM або менше, а краще 50nM або менше.

Як альтернатива, або додатково, може бути оцінена здатність антитіла до блокування HER-ліганд-стимульованої тирозинової фосфорилляції HER-рецептора, присутнього в HER-гетероолігомері. Наприклад, клітини, які ендогенно експресують HER-рецептори або трансфектовані до їх експресування, можуть інкубуватися з антитілом і потім досліджуватися на предмет HER-ліганд-залежної тирозинової фосфорилляційної активності, використовуючи антифосфотирозинові моноклональні антитіла (які довільно кон'юговані з міткою, яку можна розпізнати). Дослідження кіназного рецептора описане у U.S. Patent No. 5,766,863, також доступне для визначення HER-рецепторної активації та блокування цієї активації антитілом.

В одному з прикладів здійснення винаходу, визначається антитіло, яке пригнічує HRG-стимуляцію p180 тирозинової фосфорилляції у MCP7-клітинах, як описано у WO 01/00245. Наприклад, MCF7-клітини можуть досліджуватися у 24-чарункових тарілках та моноклональні антитіла до HER2 можуть додаватися до кожної чарунки та інкубуватися протягом 30 хвилин при кімнатній температурі; потім rHRGβ1¹⁷⁷⁻²⁴⁴ можуть додаватися до кожної чарунки до кінцевої концентрації 0.2nM, та інкубація може продовжуватися до 8 хвилин. Середовище може аспіруватися з кожної чарунки та реакції можуть зупинятися шляхом додавання 100 μl SDS буферного зразку (5% SDS, 25 mM DTT, та 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Кожний зразок (25 μl) може піддаватися електрофорезу у 4-12% гелі (Novex) та потім переноситься за допомогою електрофорезу до полівінілідифторидної мембрани. Антифосфотирозиновий (1 μg/ml) імуноблоттінг може розвиватися та інтенсивність предомінантного реактивного тяжу з M_r -180,000 може підраховуватися шляхом відображальної денситометрії. Обране антитіло буде переважно пригнічувати HRG-стимуляцію p180 тирозинової фосфорилляції до приблизно 0-35% від контрольного в

цьому дослідженні. Крива доза-відповідь для пригнічення HRG-стимуляції р 180 тирозинової фосфорилляції, яка визначена відображальною денситометрією, може бути намальована та IC₅₀ для антитіла, що представляє інтерес, може бути підрахована. В одному випадку антитіло, яке блокує ліганду активації HER-рецептора, буде мати IC₅₀ для пригнічення HRG-стимуляції р180 тирозинової фосфорилляції у цьому досліді приблизно 50nM або менше, а краще 10nM і менше. Там, де антитіло є фрагментом антитіла, таким як Fab-фрагмент, IC₅₀ для пригнічення HRG-стимуляції р180 тирозинової фосфорилляції в цьому досліді може, наприклад, бути приблизно 100nM або менше, а краще 50nM і менше.

Також можна оцінити ефективність пригнічення росту антитіла на MDA-MB-175-клітинах, наприклад, як описано у Schaefer et al. *Oncogene* 15:1385-1394(1997). Відповідно до цієї оцінки, MDA-MB-175-клітини можуть очищатися за допомогою моноклонального антитіла до HER2 (10μg/мл) за 4 дні та фіксуватися за допомогою кристалвіолету. Інкубація з антитілом до HER2 може виявити ефект пригнічення росту на цій лінії клітин, подібний до показаного моноклональним антитілом 2C4. У наступному випадку екзогенний HRG не змінить суттєво цього пригнічення. Перважно антитіло буде здатне пригнічувати проліферацію клітин MDA-MB-175 в більшій мірі, ніж моноклональне антитіло 4D5 (та іноді в більшій мірі, ніж моноклональне антитіло 7F3), у присутності або відсутності екзогенного HRG.

В одному випадку антитіло до HER2, яке представляє інтерес, може блокувати херегулін-залежну асоціацію HER2 з HER3 в обох MCF7 та SK-BR-3-клітинах, як визначено у ко-імунопреціпитантному експерименті, такому як описаний у WO 01/00245 в основному більш ефективно, ніж моноклональне антитіло 4D5, та краще більш ефективно, ніж моноклональне антитіло 7F3.

Для ідентифікації антитіл до HER2, які є інгібіторами росту, можна визначати антитіла, які пригнічують ріст ракових клітин, які надекспресують HER2. В одному випадку антитіло вибору, що пригнічує ріст, здатне пригнічувати ріст SK-BR-3-клітин в культурі клітин приблизно на 20-100% та краще приблизно на 50-100% при концентрації антитіл приблизно 0,5 - 30 μg/мл. Для ідентифікації таких антитіл може проводитися SK-BR-3-дослід, описаний у U.S. Patent No. 5,677,171. Відповідно до цього досліді, SK-BR-3-клітини, вирощуються у суміші F12 та середовища DMEM у пропорції 1:1 з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки, глутаміну та пеніциліну і стрептоміцину. SK-BR-3-клітини помішують на 20,000 клітин у 35мм тарілки клітинної культури (2mls/35мм тарілка). 0,5 - 30 μg/мл HER2-антитіл може додаватися до тарілки. Після шести днів кількість клітин у порівнянні з неочищеними клітинами рахується з використанням електронного підраховувача клітин COULTERJ. Такі антитіла, які пригнічують ріст SK-BR-3-клітин приблизно на 20-100% або приблизно 50-100% можуть бути обрані як антитіла, що пригнічують ріст. Дивись US Pat No. 5,677,171 щодо

досліджень антитіл, що пригнічують ріст, таких як 4D5 та 3E8.

Для обрання антитіл, які індукують апоптоз можливе використання аннексин-зв'язуючого досліді з використанням BT474-клітин. BT474-клітини культуються та висіваються на тарілках, як це описано у попередньому параграфі. Середовище потім видаляється та переміщується з окремим свіжим середовищем або середовищем, яке має у своєму складі 10 μg/мл моноклональних антитіл. Після трьох днів інкубаційного періоду моношари відмиваються за допомогою PBS та відділяються шляхом трипсинізації. Потім клітини центрифугуються та ресуспензуються в Ca²⁺-зв'язувальному буфері та порівню поміщаються у пробірки, як це описано вище, для дослідження знищення клітин. Потім в пробірки додають мічений аннексин (наприклад, аннексин V-FTIC) (1μg/мл). Зразки можуть аналізуватися, використовуючи проточний цитометр FACSCANJ та програмне забезпечення FACSCONVERTJ CellQuest (Becton Dickinson). Такі антитіла, які індукують статистично значимі рівні зв'язування аннексину, подібні до контрольних, обираються як апоптоз-індукуючі антитіла. Крім аннексин-зв'язуючого досліді, можливе проведення досліді з забарвленням ДНК, з використанням BT474-клітин. Для виконання цього досліді BT474-клітини, які були очищені антитілом, яке представляє інтерес, як було описано в попередніх двох пунктах, інкубують з 9μg/мл HOECHST 33342J на 2 год при 37°C, і потім аналізують на проточному цитометрі EPICS ELITEJ (Coulter Corporation) з використанням програмного забезпечення MODFIT LTJ (Verity Software House). Антитіла, які індукують зміни в частці клітин апоптозу, яка більша у 2 рази (краще в 3 рази більша) ніж неочищених клітин (до 100% клітин апоптозу) можуть бути обрані як про-апоптичні антитіла відповідно до цього дослідження. Дивись WO98/17797 щодо досліджень антитіл, які індукують апоптоз, таких як 7C2 та 7F3.

Для виділення антитіл, які приєднуються до епітопу на антитілі до HER2, яке представляє інтерес, може проводитися стандартне перехресно-блокуюче дослідження, таке як описане у Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), для досягнення перехресного блокування антитілом зв'язування антитіла, такого як 2C4 або Пертузумаб, до HER2. Як альтернатива, може проводитися картування епітопів відомими способами та/або вивчення структури HER2-антитіла (Franklin et al. *Cancer Cell* 5:317-328 (2004)) для того, щоб дізнатися, що зв'язує домен (домени) антитіла до HER2.

(ix) Композиції Пертузумабу

За одним з варіантів реалізації композиції антитіла до HER2, така композиція має у своєму складі суміш основних видів антитіл Пертузумабу та одного або кількох їх варіантів. Варіант основних видів антитіл Пертузумабу, якому тут надається перевага, має у своєму складі варіабельну легку та варіабельну важку амінокислотну послідовність у SEQ ID Nos. 3 та 4, та найкраще включає легкий ланцюг амінокислотної послідов-

ності, обраної з SEQ ID No. 13 та 17, та важкий ланцюг амініокислотної послідовності, обраної з SEQ ID No. 14 та 18 (включаючи деаміновані та/або окислені варіанти цих послідовностей). Одна з композицій має у своєму складі суміш основних видів антитіл Пертузумабу та варіант амінокислотної послідовності, який має лідерне подовження на аміно-кінці. Переважно лідерне подовження на аміно-кінці знаходиться на легкому ланцюзі варіанту антитіла (наприклад, на одному або двох легких ланцюгах варіанту антитіла). Основні види антитіла до HER2 або варіанту антитіла можуть бути повнорозмірними антитілами або фрагментами антитіла (наприклад, Fab з F(ab')₂ фрагментів), але краще - обидва повнорозмірні антитіла. Антитільний варіант може мати у своєму складі лідерне подовження на аміно-кінці на одному або більше важкому або легкому ланцюгах. Краще, якщо лідерне подовження на аміно-кінці знаходиться на одному або двох легких ланцюгах антитіла. Лідерне подовження на аміно-кінці переважно має у своєму складі VHS-. Присутність лідерного подовження на аміно-кінці може бути визначена різними аналітичними технологіями, включаючи, але не обмежуючись, аналізом N-кінцевої послідовності, оцінкою заряду гетерогенності (наприклад, катіонобінна хроматографія або капілярний електрофорез), мас-спектрометрією тощо. Кількість варіантів антитіл у композиції загалом знаходиться в межах від кількості, яка складає межу для визначення будь-яким дослідженням (переважно аналіз N-кінцевої послідовності), що використовується для визначення варіанту до кількості, яка менша за кількість основних видів антитіла. Загалом, приблизно 20% або менше (наприклад, від близько 1% до близько, 15%, зокрема від 5% до приблизно 15%) молекул антитіл в композиції мають у своєму складі лідерне подовження на аміно-кінці. Такий відсоток найкраще визначається, використовуючи кількісний аналіз N-кінцевої послідовності (найкраще з використанням високої роздільності, катіонобінної колонії з низькою концентрацією, такої як PROP AC WCX-10J катіонобінна колонна). Навпроти лідерного подовження на аміно-кінці розглядається амінокислотна послідовність альтернативного основного виду антитіла та/або варіанту, включаючи, але не обмежуючись, антитіло, яке має в своєму складі C-кінцевий залишок лізину на одному або двох важких ланцюгах, деамінований варіант антитіла тощо.

Крім того, основні види антитіла або варіанту можуть мати в своєму складі глікозильовані варіанти, невичерпні приклади яких включають антитіло, що містить G1 або G2 олігосахаридні структури, прикріплені до його Fc-ділянки, антитіло, що має в своєму складі вуглеводний фрагмент, прикріплений до легкого ланцюга (наприклад, один або кілька вуглеводних фрагментів, таких як глюкоза або галактоза, прикріплені до одного або двох легких ланцюгів антитіла, наприклад прикріплені до залишків лізину) антитіла, що має в своєму складі один або більше неглікозильовані важкі ланцюги, або антитіла, що має в своєму складі сіаловий

олігосахарид, прикріплений до одного або двох важких ланцюгів тощо.

Композиція може регенеруватися з генетично створених ліній клітин, наприклад, лінія клітин яєчників китайського хом'ячка (CHO), які експресують антитіла до HER2 або може готуватися шляхом пептидного синтезу.

(х) Імунокон'югати

Винахід також стосується імунокон'югат, які включають антитіло, кон'юговане з цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний агент, токсин (наприклад, маленька молекула токсину або ферментноактивний токсин бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи фрагменти та/або варіанти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіокон'югата).

Хіміотерапевтичні агенти, що використовуються для генерації таких імунокон'югат, описано вище. Також розглядаються кон'югати антитіла та однієї або більше маленьких молекул токсина, такого як калхіміцин, мейтанцин (U.S. Patent No. 5,208,020), трихотен та CC1065.

В одному з бажаних варіантів здійсненні винаходу, антитіло кон'юговане з однією або кількома молекулами мейтанцину (наприклад, приблизно 1-10 молекул мейтанцину на одну молекулу антитіла). Мейтанцин може, наприклад, перетворюється на May-SS-Me, який може зменшуватися до May-SH3 та реактивуватися модифікованим антитілом (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)) для генерації мейтанциноїд-антитільного кон'югату.

Інша імунокон'югата, яка представляє інтерес, має в своєму складі антитіло, кон'юговане з однією або більше молекулою калхіміцину. Родина антибіотиків калхіміцину здатна призводити до розривів двоспіральної ДНК у субпікомольних концентраціях. Структурні аналоги калхіміцину, які також можуть використовуватися, включають, але не обмежуються, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetyl- γ_1^I , PSAG та θ_1^I (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) та Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Дивись також, US Patent Nos. 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; та 5,773,001.

Ферментно активні токсини та їхні фрагменти, які можуть використовуватися, включають ланцюг А дифтерії, незв'язані активні фрагменти дифтеритного токсину, ланцюг А екзотоксину (з *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, та PAP-S), інгібітор момордії харантії, курцин, кротин, інгібітор сапаонарії офіцінальної, гелонін, мітогеллін, рестріктоцин, феноміцин, еноміцин та трікотецен. Дивись, наприклад, WO 93/21232 опублікований 28 жовтня 1993р.

Даний винахід розглядає імунокон'югату сформовану між антитілом і сумішшю з нуклеотидною активністю (наприклад, рибонуклеаза або ендонуклеаза ДНК, така як дезоксирибонуклеаза; ДНаза).

Різноманітні радіоактивні ізотопи здатні створювати радіокон'юговані антитіла до HER2.

Приклади включають At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{188} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} та радіоактивні ізотопи Lu.

Кон'югата антитіла і цитотоксичного агента може створюватися, використовуючи різноманітні зчеплюючі агенти біфункціональних протеїнів, такі як N-сукциміділ-3-(2-піридилдітіол) пропіонат (SPDP), сукциніміділ-4-(N-малеїдометил) циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметил адіпімідат HCL), активні ефіри (такі як дісукциніміділу суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біазідо суміші (такі як бі-(p-азідобензоїл)-гександіамід), похідні бі-діазонію (такі як бі-(p-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанати (такі як толієн-2,6-діізоціанат), та бі-активні фтористі суміші (такі як 1,5-діфтор-2,4-дінітробензен). Наприклад, рициновий імунотоксин може готуватися як описано у Vitetta et al. *Science* 238: 1098 (1987). 1-ізоціанатбензил-3-метилдіетилен-триамінопентоцтова кислота (MX-DTPA), мічена вуглецем-14, є типовим хелатуючим агентом для кон'югації радіонуклеотиду до антитіла. Дивись WO94/11026. Зшивач може бути "розколюючим зшивачем", що полегшує виділення цитотоксичних ліків в клітині.

Наприклад, може використовуватися кислотно-лабільний зшивач, пептидаз-чутливий зшивач, диметильний зшивач або дісульфідвключаючий (Chari et al. *Cancer Research* 52: 127-131(1992)).

Як альтернатива, зшиваючий білок, який має в своєму складі антитіло і цитотоксичний агент, може бути створений, наприклад, з використанням рекомбінантної технології або пептидного синтезу.

Тут розглядаються і інші імунокон'югати. Наприклад, антитіло може зшиватися з одним з багатьох непротеїнових полімерів, наприклад, такими як поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, поліоксіалкілени або ко-полімери поліетиленгліколю та поліпропіленгліколю. Антитіло також може утримуватися у мікрокапсулі, приготуванні, наприклад, шляхом коацервації або полімеризації на межі фаз (наприклад, гідроксиметилцелюлози або желатинові мікрокапсули та полі-(метилметацилат) мікрокапсули відповідно), в системах доставки колоїдних ліків (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемulsії, нано-частинки та нанокапсули), або у макроемulsіях. Такі технології описані у Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Антитіла, які тут описані, також можна назвати імуноліпосомами. Ліпосоми мають в своєму складі антитіла, створені відомими способами, такими як описані у Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Set USA*, 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. NatlAcad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); U.S. Pat. Nos. 4,485,045 та 44,545; та 97/38731 опубліковані 23 жовтня 1997р. Ліпосоми зі збільшеним часом циркуляції описані у U.S. Patent No. 5,013,556.

Зокрема, корисні ліпосоми можуть генеруватися шляхом випаровування реверсивної фази з ліпідною композицією, що має в своєму складі фосфотидилхолін, холестерол та PEG-похідні фосфотидилетаноламіну (PEG-PE). Ліпосоми вивчаються крізь фільтри з визначеним розміром пор для отримання ліпосом визначеного діаметру. Fab'-фрагменти антитіла даного винаходу можуть кон'югуватися з ліпосомами, як описано у Martin et

al. *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) шляхом дисульфідної обмінної реакції. Хіміотерапевтичний агент іноді знаходиться у ліпосомі. Дивись Gabizon et al. *J. National Cancer Inst.* 81(19) 1484 (1989).

III. Відбір хворих для лікування

Хворий може проходити діагностичне тестування перед лікуванням. Наприклад, під час проведення діагностичного тестування можуть оцінюватися експресія HER (наприклад, HER2 або EGFR), включаючи надмірну експресію, ампліфікацію та/або активацію (включаючи фосфорилізацію або димеризацію).

Взагалі, якщо проводиться діагностичне тестування, матеріал можна взяти у хворого, який потребує лікування. Якщо це захворювання на рак, то таким матеріалом, в загальному випадку є матеріал пухлини. У бажаній реалізації цього винаходу матеріал береться з пухлини яєчника, брюшинної пухлини, пухлини фолікулярної труби, метастатичної пухлини молочної залози (MBC), недрібноклітинної карциноми легень (NSCLC), пухлини простати або рак кишечника.

Тут наводиться опис і інших терапевтичних показань для застосування антитіл до HER у разі різних незлоякісних пухлин. Якщо хворого мають лікувати від цих доброякісних проявів, відповідний матеріал можна взяти з відповідних тканин хворого та провести діагностичний аналіз як це тут описано.

При цьому біологічний матеріал може бути зафіксованим, наприклад, зафіксований формаліном і залитий парафіном (FFPE), або замороженим.

Відповідно до одного з прикладів здійснення цього винаходу, хворий, відібраний для лікування, має пухлину, що демонструє активацію HER (а краще, HER2). У іншому прикладі ступінь активації HER (або HER2) в ракових клітинах істотно перевищує рівень активації цього рецептора в неракових клітинах тканини того самого типу. Така надлишкова активація може бути результатом надмірної експресії HER рецептора та/або більшого за нормальний рівень HER лігандів, доступних для активації HER рецептора у ракових клітинах. Така надлишкова активація може бути причиною та/або викликатися злоякісним характером ракової клітини. У деяких прикладах ракове захворювання буде піддано діагностичному або прогностичному аналізу для визначення чи відбувається ампліфікація та/або відбувається надмірна експресія HER рецептора, що призводить до такої надмірної активації HER рецептора. Замість цього або додатково може бути проведено діагностичний або прогностичний аналіз для визначення, чи відбувається у раковій пухлині ампліфікація та/або надмірна експресія HER ліганду, що зумовлюється надмірною активацією рецептора. У підгрупі таких раків надмірна активація цього рецептора може бути наслідком аутокринної стимуляції. Більш детально різні процедури аналізів для визначення HER активації будуть описані нижче.

(i) HER димери

Матеріал пухлин може аналізуватися на присутність HER димерів, які вказують на активацію HER або HER2. Для визначення HER2 димерів у

пухлинах можна застосувати будь-який з відомих способів, таких як EGFR-HER2, HER2-HER3. Нижче наводиться опис кількох таких способів, застосування яких є бажаним. Ці способи виявляють нековалентні білок-білок взаємодії або у інший спосіб визначають близькість білків, що становлять інтерес.

Способи, що основані на імунній афінності, такі як імунопреципітація або ELISA, можуть використовуватися для визначення HER димерів. У одному з прикладів антитіла до HER2 використовуються для імунопреципітації комплексів, до складу яких входить HER2 з пухлинних клітин, а імунопреципітат, що утворюється, потім досліджується на присутність EGFR або HER3 з використанням імуноблотингу. У іншому прикладі EGFR або HER3 антитіла можуть використовуватися на етапі імунопреципітації, а потім імунопреципітат досліджується за допомогою HER2 антитіла. У ще іншому прикладі специфічні до EGFR, HER3, EGFR/HER2 комплексів або HER2/HER3 комплексів HER ліганди можуть використовуватися для преципітації комплексів, які потім досліджуються на вміст HER2. Наприклад, ліганди можуть з'єднуватися з авідіном та комплексами, очищеними на біотинової колонці.

У іншому прикладі аналізи такого типу як ELISA або на антитіла «бутербродного» типу антитіла до HER2 іммобілізуються на твердій основі, що контактують з клітинами пухлини або лізатом клітин пухлини, відмиваються, а потім піддаються впливу антитіла проти EGFR або HER3. Зв'язування останнього антитіла, яке можна виявити безпосередньо або за допомогою вторинного антитіла, до якого приєднана мітка, яку можна виявити, вказує на присутність гетеродимерів. У певних прикладах іммобілізуються антитіла EGFR або HER3, а HER2 антитіла використовуються на етапі виявлення. У інших втіленнях HER ліганди можуть використовуватися замість або в комбінації з HER антитілами.

Для ковалентного зв'язування димерів на поверхні живих клітин також можна застосувати хімічне або УФ зшивання (Hunter et al., *Biochem. J.*, 320:847-53). Приклади хімічних речовин, що можуть забезпечити таке зшивання, включають дітіобіс(сукциніміділ) пропіонат (DSP) та 3,3-дітіобіс(сульфосукциніміділ) пропіонат (DTSSP). У одному прикладі клітинні екстракти з хімічно зшитих пухлинних клітин аналізуються SDS-PAGE та мітаються антитілами до EGFR та/або HER3. Значний зсув діапазону відповідної молекулярної ваги найвірогідніше вказує на EGFR-HER2 або HER2-HER3 димери оскільки HER2 є димеризаційним партнером для EGFR та HER3, якому надається перевага. Цей результат може бути підтверджено наступним застосуванням методу імуноблотингу з антитілами до HER2.

Для виявлення EGFR-HER2 або HER2-HER3 димерів також можна використати флуоресцентний резонансний перенос енергії (FRET). FRET виявляє конформаційні зміни білку та білок-білок взаємодії *in vivo* та *in vitro* на основі переносу енергії від донорного флуорофора до акцепторного флуорофора (Selvin, *Nat. Struct. Biol.* 7:730-34

(2000)). Перенос енергії відбувається тільки якщо донорний флуорофор розташований достатньо близько до акцепторного флуорофора. У типовому FRET експерименті два білки або два центри на одному білку мітаються різними флуоресцентними зондами. Один з цих зондів, донорний зонд, збуджується до більш високого енергетичного стану падаючим світлом з певною довжиною хвилі. Потім донорний зонд передає свою енергію другому зонду, акцепторному зонду, що призводить до зменшення інтенсивності флуоресценції донора та збільшення флуоресцентного випромінювання акцептора. Для виміру ступеня переносу енергії інтенсивність флуоресценції донора у матеріалі, поміченому донорними та акцепторними зондами, порівнюється з інтенсивністю у матеріалі, поміченому лише донорним зондом. Інтенсивність флуоресценції акцептора також можна порівнювати у донор-акцепторній та лише акцепторній пробах. Відповідні зонди відомі фахівцям і до їхнього переліку входять, наприклад, барвники, що проникають через мембрани, такі як флуоресцеїн та родамін, органічні барвники, такі як ціанінові барвники, та атоми лантанідів (Selvin, див. вище). Методи та прилади для виявлення та вимірювання переносу енергії також відомі фахівцям (Selvin, див. вище).

Методики на основі FRET, придатні для виявлення та вимірювання білок-білок взаємодії в окремих клітинах, також відомі фахівцям. Наприклад, для виявлення димеризації поверхневих рецепторів клітин можна використати мікроскопію донорного фотовідбілювального флуоресцентного резонансного переносу енергії (pbFRET) та флуоресцентну мікроскопію візуалізації тривалості життя (FLIM) (Selvin, див. вище; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.* 129:1543-58 (1995)). В одному прикладі фвФРПЕ використовується на клітинах або «у суспензії» або «*in situ*» для виявлення та виміру утворення EGFR-HER2 або HER2-HER3 димерів, як це описано у Nagy et al., *Cytometry*, 32:120-131 (1998). Ці методики вимірюють скорочення часу флуоресценції донора через перенос енергії. У конкретному прикладі для дослідження EGFR-HER2 та HER2-HER3 димеризації можна застосувати методику FRET з використанням проточної цитометрії типу Foerster (FCET) як це описано в Nagy et al., вище та Brockhoff et al., *Cytometry*, 44:338-48 (2001).

FRET краще використовувати разом із стандартними методами імуноблотингу (Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001)). Наприклад, як зонди для мічення двох різних білків можна використати антитіла, зв'язані з відповідним флуоресцентними барвниками. Якщо білки розташовані на малій відстані один від одного, флуоресцентні барвники поведуть себе як донори та акцептори для FRET. Перенос енергії реєструється стандартними засобами. Перенос енергії можна виявити засобами проточної цитофлуориметрії або системами цифрової мікроскопії, такими як конфокальна мікроскопія або широкопольова флуоресцентна мікроскопія у поєднанні з камерою зарядо-спарованого пристрою (CCD).

В одному прикладі даного винаходу HER2 антитіла та EGFR або HER3 антитіла прямо мітяться двома різними флуорофорами, наприклад, як це описано у Nagy et al., див. вище. Забезпечують контакт пухлинних клітин або лізату пухлинних клітин з диференційовано міченими антитілами, що відіграють роль донорів та акцепторів для ФРПЕ у присутності EGFR-HER2 або HER2-HER3 димерів. У іншому варіанті немічені антитіла проти HER2 та EGFR або HER3 використовуються поряд із диференційовано міченими вторинними антитілами, що слугують донорами та акцепторами (наприклад, Brockhoff et al., див. вище). Перенос енергії виявляється та присутність димерів визначається, якщо мітки розташовані у безпосередній близькості.

В інших прикладах у специфічні до HER2 та HER1 або HER3 ліганди HER рецептора вноситься флуоресцентна мітка і вони використовуються для FRET досліджень.

У ще інших прикладах здійснення даного винаходу присутність димерів на поверхні пухлинних клітин демонструється спільною локалізацією HER2 з EGFR або HER3 з використанням стандартних прямих або опосередкованих імунофлуоресцентних методик та мікроскопії конфокального лазерного сканування. В іншому варіанті для виявлення зв'язування антитіл та спільної локалізації HER2 з або EGFR або HER3 використовується візуалізація методом лазерного сканування (LSI) у форматі високої продуктивності, такому як планшет з мікрорунками (Zuck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11122-27(1999)).

У подальших прикладах присутність EGFR-HER2 та/або HER2-HER3 димерів встановлюється шляхом визначення ферментативної активності, що залежить від близькості димерних компонентів. HER2 антитіло зв'язується з одним ферментом та EGFR або HER3 антитіло зв'язується з другим ферментом. Перший субстрат для першого ферменту додається і в результаті реакції утворюється другий субстрат для другого ферменту. Це призводить до реакції з іншою молекулою з утворенням сполуки, такої як барвник, яку можна виявити. Присутність іншого препарату руйнує другий субстрат, що відвертає реакцію з другим ферментом, якщо тільки перший та другий ферменти, а отже і два антитіла, не знаходяться у безпосередній близькості. У окремому прикладі забезпечується контакт пухлинних клітин або клітинних лізатів з HER2 антитілом, що з'єднується з глюкозооксидазою та HER3 або HER1 антитілом, що зв'язується з пероксидазою хрому. До реагентів додають глюкозу поряд із попередником барвника, такого як DAB, та каталазою. Присутність димерів визначається за виникненням кольору барвника.

Димери також можна визначати з використанням способів на основі системи аналізу eTag™ (компанія Aclara Bio Sciences, Маунтин В'ю, шт. Каліфорнія), а також (наприклад, U.S. Patent Application 2001/0049105, опубліковано 6 грудня 2001 р.), обидва з яких повністю включені до цього документу посиланням. eTag™ або «електрофоретичний ярлик» включає частку з міткою, таку як флуоресцентна група, що піддається визначенню.

eTag™ також може включати «модифікатор мобільності», який по суті складається з часток, що мають унікальну електрофоретичну мобільність. Ці частки дають змогу відокремити та виявити eTag™ у складній суміші за визначених електрофоретичних умов, таких як капілярний електрофорез (CE). Частина eTag™, що містить мічену частку та, можливо, модифікатор мобільності, приєднана до частки, що зв'язується з першою мішенню за допомогою зв'язкової групи, яка легко розщеплюється з утворенням першої сполуки, що зв'язується з мішенню. Частка, що зв'язується з першою мішенню, специфічно впізнає певну першу мішень, таку як нуклеїнову кислоту або білок. Частка, що зв'язується з першою мішенню, не обмежується ніяким чином і може бути, наприклад, полінуклеотидом або поліпептидом. Бажано щоб частка, що зв'язується з першою мішенню, була антитілом або фрагментом антитіла. В іншому варіанті частинка, що зв'язується з першою мішенню, може бути лігандом HER рецептора або відповідним за зв'язування його фрагментом.

Бажано щоб до складу групи, що забезпечує зв'язування, входила частка, що розщеплюється, така як субстрат ферменту або така, що має будь-який хімічний зв'язок, який може бути розщепленим за певних умов. Коли частка, що зв'язується з першою мішенню, приєднується до своєї мішені, агент, що розщеплюється, вводиться та/або активується, і група, що зв'язується, розщеплюється, вивільняючи таким чином частку eTag™, що містить мічену частку та модифікатор мобільності. Таким чином, присутність «вільного» eTag™ вказує на зв'язування частки, що зв'язується з мішенню, зі своєю мішенню.

Бажано щоб до складу другої сполуки, що зв'язується, входив агент, який легко розщеплюється і частка, що зв'язується із другою мішенню, яка специфічно розпізнає другу мішень. Частка, що зв'язується із другою мішенню, також не обмежується жодним чином і може бути, наприклад, антитілом або фрагментом антитіла або лігандом HER рецептора або лігандним фрагментом, що відповідає за зв'язування. Агент, що розщеплює, є таким, що він розщепить лише зв'язуючу групу у першій зв'язуючій сполуці якщо перша та друга зв'язуючі сполуки розташовані у безпосередній близькості.

В одному прикладі здійснення даного винаходу до складу першої зв'язуючої сполуки входить eTag™, у якому антитіло до HER2 слугує часткою, що зв'язується із першою мішенню. До складу другої зв'язуючої сполуки входить антитіло до EGFR або HER3, що приєднане до агента, що розщеплює і здатний розщепити зв'язуючу групу eTag™. Бажано щоб було потрібно активувати агент, що розщеплює, для того щоб бути в змозі розщепити зв'язуючу групу. Пухлинні клітини або ліганди пухлинних клітин контактують з eTag™, який зв'язується з HER2 та з модифікованими EGFR або HER3 антитілами, що зв'язуються з EGFR або HER3 на поверхні клітини. Бажано щоб вільна сполука, що зв'язується прибиралася, а агент, що розщеплює, активувався, якщо це необхідно. Якщо присутні EGFR-HER2 або HER2-HER3 димери,

агент, що розщеплює, розщепить групу, що зв'язує, і вивільнить eTag™ завдяки близькості агента, що розщеплює до групи, що зв'язує. Тоді вільний eTag™ можна виявити будь-яким відомим фахівцям способом, таким як капілярний електрофорез.

В одному з прикладів агентом, що розщеплює, є хімічні речовини, що активуються і діють на групу, що зв'язує. Наприклад, агент, що розщеплює, може бути активованим під впливом світла.

В іншому прикладі eTag™ конструюється з використанням антитіла до EGFR або HER3 як частини, що зв'язується із першою мішенню, а друга сполука, що зв'язується, конструюється з антитіла до HER2.

Ще в іншому прикладі HER димер виявляється з використанням антитіла або іншого реагенту, що специфічно або переважно зв'язується з димером у порівнянні із таким зв'язуванням з або HER рецептором у димера.

(ii) HER2 фосфориліація

Імунопреципітація з антитілом до EGFR, HER2, або HER3, як це обговорювалося у попередньому розділі, може, але не обов'язково, супроводжуватися функціональним аналізом димерів замість або додатково до імуноблотингу. В одному прикладі імунопреципітація антитілом до HER3 супроводжується аналізом на активність рецептора тирозинкінази у імунопреципітаті. Через те, що HER3 не має притаманної тирозинкіназної активності, присутність тирозинкіназної активності у імунопреципітаті вказує на те, що HER3 найбільш імовірно зв'язаний із HER2 (Graus-Porta et al. *EMBOJ.*, 16:1647-55 (1997); Klapper et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4995-5000 (1999)). Цей результат може бути підтверджено методом імуноблотингу антитілами до HER2. У іншому прикладі імунопреципітація антитілом до HER2 супроводжується аналізом на тирозинкіназну активність EGFR рецептора. У цьому аналізі забезпечують контакт імунопреципітату із радіоактивним ATP та пептидним субстратом, що імітує *in vivo* центр трансфосфориліації HER2 за допомогою EGFR. Фосфориліація пептиду вказує на спільну імунопреципітацію, а отже димеризацію EGFR за допомогою HER2. Методи аналізу тирозинкіназної активності рецептора добре відомі спеціалістам та включають методи, що виявляють фосфориліацію цільових субстратів, наприклад, антитілом фосфотирозину, та активацію спорідненого шляху передачі сигналу, такого як шлях MAPK.

Фосфориліацію HER рецептора можна оцінити імунопреципітацією одного або більше HER рецепторів, таких як HER2 рецептор та Western-аналізом фарбування. Наприклад, позитивність визначається присутністю фосфор-HER2 зв'язку на гелі з використанням анти-фосфотирозин антитіла для виявлення фосфорильованого(их) залишку(ів) тирозину у імунопреципітаті HER рецептора(ів). Антифосфотирозин антитіла виробляються на комерційній основі компанією Pan Vera (Медисон, шт. Вісконсін), філія компанії Invitrogen, Chemicon International Inc. (Темекула, шт. Каліфорнія) або компанією Upstate Biotechnology (Лек Плассід, шт. Нью Йорк). Негативність виявляється за відсутністю зв'язку.

В іншому прикладі фосфориліація HER2 (HER2) рецептора оцінюється імуногістохімічно з використанням фосфор-специфічного антитіла до HER2 (клон PN2A; Thor et al., *J. Clin. Oncol*, 18(18):3230-3239 (2000)).

Інші методи виявлення фосфориліації HER рецептора(ів) включають, але не обмежуються, KIRA ELISA (U.S. Patent Nos. 5,766,863; 5,891,650; 5,914,237; 6,025,145; та 6,287,784), маспектрометрію (порівняння розміру фосфорильованого та нефосфорильованого HER2) та аналізу близькості до e-tag як з антитіла до HER (наприклад, HER2), так і фосфор-специфічного або фосфор-тирозин специфічного антитіла (наприклад, з використанням набору для eTag™ аналізу, що випускається компанією Aclara BioSciences (Маунтін В'ю, шт. Каліфорнія)). Детально eTag аналіз описано вище.

Можна також використовувати фосфор-специфічні антитіла у клітинній матриці для виявлення фосфориліаційного статусу в клітинному матеріалі білка, що передає сигнал (US2003/0190689).

(iii) Профіль генної експресії

У одному прикладі аналіз генної експресії може слугувати як заміник прямого вимірювання HER фосфориліації або активації. Це особливо корисно коли матеріал є фіксованим (наприклад, у парафіні, матеріал пухлини, зафіксований формаліном), де HER фосфориліацію може бути важко надійно виміряти. За цим способом оцінюється експресія двох або більше HER рецепторів та одного або більше HER лігандів у матеріалі, при цьому експресія двох або більше HER рецепторів та одного або більше HER лігандів вказує на позитивну HER фосфориліацію або активацію у пробі. В одному прикладі реалізації цього способу експресія бетацелуліну та/або амфірегуліну у матеріалі може бути виміряна, при цьому експресія бетацелуліну та/або амфірегуліну вказує на позитивну HER фосфориліацію або активацію у матеріалі.

За цим способом матеріал від хворого тестується на експресію двох або більше HER рецепторів (бажано, відібраних серед EGFR, HER2, та HER3) та одного або більше HER лігандів (бажано, відібраних серед бетацелуліну, амфірегуліну, епірегуліну та TGF- α , найбільш бажано, бетацелуліну або амфірегуліну). Наприклад, двома або більше HER рецепторами можуть бути EGFR та HER2 або HER2 та HER3. Бажано визначити експресію HER2 та EGFR або HER3, а також бетацелуліну або амфірегуліну. Матеріал можна тестувати лише на експресію бетацелуліну або амфірегуліну або в комбінації з тестуванням на експресію двох або більше HER рецепторів. Позитивна експресія вказаного(их) гену(ів) вказує на те, що хворий є кандидатом на проведення лікування HER антитілом, таким як пертузумаб. Більш того, позитивна експресія гену(ів) вказує на те, що у хворого з більшою імовірністю буде сприятлива реакція на лікування HER антитілом, ніж у хворого, який не має такої позитивної експресії.

Різні способи визначення експресії мРНК або білка включають, але не обмежуються, профілювання генної експресії, ланцюгову реакцію полімерази (PCR), включаючи кількісну PCR у реальному

часі (qRT-PCR), аналіз мікроматриці, послідовний аналіз генної експресії (SAGE), MassARRAY, аналіз експресії гена за допомогою масового паралельного визначення послідовності сигнатур (MPSS), методу протеоміксу, імуногістохімії (IHC) і т.ін. Бажають мати кількісні дані стосовно мРНК. Такий аналіз мРНК бажано виконувати з використанням методики полімеразної ланцюгової реакції (PCR) або аналізу мікро-матриці. Коли застосовується ПЛР, бажаною є кількісна форма PCR у реальному часі (qRT-PCR). В одному прикладі експресія одного або більшої кількості генів вважається позитивною, якщо вона розташована на медіані або вище, наприклад, у порівнянні з іншими матеріалами пухлин того самого типу. Медіанний рівень експресії фактично може бути визначено одночасно з виміром експресії гена або може бути визначено раніше.

Різні типові методи визначення генної експресії, кроки типового протоколу для профілювання генної експресії з використанням зафіксованих, парафінованих тканин як джерела РНК, включаючи мРНК виділення, очищення, основи випрямлення та ампліфікації наведені у різних опублікованих журнальних статтях (наприклад, Godfrey et al. *J. Molec. Diagnostics* 2: 84-91 (2000); Specht et al., *Am. J. Pathol.* 158: 419-29 (2001)). Коротко, типовий процес починається з приготування приблизно 10 мікрограмових товстих зрізів з залитого парафіном матеріалу пухлинної тканини. Потім екстрагується РНК, а білок та ДНК видаляються. Після визначення концентрації РНК у разі необхідності можуть бути проведені додаткові етапи з репарації та/або ампліфікації РНК; РНК зворотно транскрибується з використанням ген специфічних промоторів, після чого слідує процедура PCR. На завершення процедури дані аналізуються для визначення найкращого(их) варіанта(ів) лікування, серед показаних хворому за даними особливостей моделі генної експресії, визначеної у дослідженому матеріалі пухлини.

(iv) HER експресія та ампліфікація

Для визначення HER експресії або ампліфікації у раковій пухлині існують різні діагностично-прогностичні методи аналізу. В одному прикладі надмірна експресія HER може аналізуватися методом IHC, наприклад, з використанням HERCEPTEST® (Dako). Зрізи парафінованого матеріалу пухлини, одержані методом біопсії, можуть бути піддані IHC аналізу з бальною оцінкою інтенсивності фарбування білка HER2 наступним чином.

Бал 0 - фарбування не виявлено або фарбування мембрани спостерігається у менш як 10% пухлинних клітин.

Бал 1+ - спостерігається слабка або ледве помітна забарвленість мембрани у більш як 10% пухлинних клітин. Клітини забарвлені тільки у деяких ділянках їхніх мембран.

Бал 2+ - спостерігається слабка, або помірна повна забарвленість мембран, виявлена більш як в 10% пухлинних клітин.

Бал 3+ - спостерігається повна забарвленість мембран від помірної до інтенсивної більш, ніж 10% пухлинних клітин.

Клітини з 0 або 1+ балами оцінки експресії HER2 можуть характеризуватися як такі, що не мають надмірної експресії HER2, тоді як у разі 2+ або 3+ балів вони можуть характеризуватися як такі, що мають надмірну експресію.

Пухлини, що мають надмірну експресію HER2 можуть оцінюватися імуногістохімічними балами відповідно до кількості копій HER2 молекул експресованих на одну клітину, і можуть бути визначені біохімічно:

0 = 0-10 000 копій/клітина,

1+ = принаймні близько 200 000 копій/клітина

+ = принаймні близько 500 000 копій/клітина,

3+ = принаймні близько 2 000 000 копій/клітина.

Надмірна експресія HER2 на рівні 3+, що призводить до ліганднезалежної активації тирозинкінази (Hudziak et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7159-7163 (1987)), трапляється у приблизно 30% випадків раку молочної залози, і у цих хворих тривалість безрецидивного періоду та загальна тривалість життя зменшені (Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987)).

Як альтернативу або додатково можна провести FISH аналіз такий як INFORM™ (продається фірмою Ventana, шт. Арізона) або PATHVISION™ (Візіс, шт. Іллінойс) зафіксованого формаліном і залитого в парафін матеріалу пухлини для визначення ступеня (якщо вона проявляється) HER2 ампліфікації у пухлині.

В одному прикладі рак буде виступати чинником, який викликає експресію (і, можливо, надмірну) EGFR; таку експресію можна оцінити зазначеними вище методами оцінки експресії HER2.

Надмірна експресія HER рецептора або HER ліганда або ампліфікація може також бути оцінена з використанням діагностичного аналізу *in vivo*, наприклад, шляхом введення молекули (такої як антитіло) з міткою, яка піддається виявленню (наприклад, радіоактивний ізотоп), яка приєднується до молекули, що має бути виявлена, з наступним проведенням зовнішнього сканування хворого для визначення місця локалізації мітки.

IV. Технологія приготування лікарського засобу

Терапевтичні форми антитіл, що використовуються відповідно до даного винаходу, готуються для зберігання шляхом змішування антитіла, що має бажану ступінь чистоти, з довірливими фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), у ліофілізованих формі або водних розчинах. Прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів за доз та концентрацій, що використовуються, та включають буфери, такі як фосфати, цитрати та інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін, консерванти (такі як октадецилметилбензил амоній хлорид, гексаметонін хлорид, бензалконіум хлорид, бензетоніум хлорид, фенол, бутіл або фенілкарбінол, алкільні парабени такі як метил або пропіл парабен, катехол; резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол; та т-крезол); поліпептиди з

низькою молекулярною вагою (менше за приблизно 10 радикалів), білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни, гідрофільні полімери такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатні добавки такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трехалоза або сорбіт; солеутворювальні протиіони, такі як натрій; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіонні сурфактанти такі як TWEENJ, PLURONICS J або поліетіленгліколь (PEG). Ліюфілізовані форми антитіл описані в WO 97/04801, і прямо включені до цього документа посиланням.

Бажана форма пертузумабу для терапевтичного використання включає 30 мг/мл пертузумабу у 20 mM гістидин ацетату, 120 mM цукрози, 0,02 % полісорбата за pH 6,0. Альтернативна форма пертузумабу включає 25 мг/мл пертузумабу, 10 mM гістидин- HCl буфера, 240 mM цукрози, 0,02 % полісорбату, pH6,0. При цьому ця форма у разі необхідності може також містити більш як одну активну сполуку для лікування за спеціальними показаннями, бажано, з додатковими властивостями, які не мають несприятливого впливу одне на інше. Різні препарати, які можуть комбінуватися з антитілом до HER, описані нижче у секції, що стосується способів лікування. Такі молекули відповідним чином присутні у комбінації у кількості, що є ефективними для мети, що намічена.

Активні інгредієнти можуть також міститися у мікрокапсулах, що приготовлені, наприклад, методом консервації або методами полімеризації на поверхні розподілу, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатин-мікрокапсули та полі(метилметацилатні) мікрокапсули, відповідно, у колоїдній системі поставки ліків (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастки та нанокапсули) або у макроемульсіях. Такі методики описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можуть бути приготовлені препарати з уповільненням вивільненням. Відповідні приклади препаратів з уповільненням вивільнення включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, матриці яких мають вид сформованого виробу, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриць для уповільненого вивільнення включають поліестери, гідрогелі (наприклад, полі(2-гідроксиетил-метакрілат), або полі(вінілалкоголь)), полілактиди (U.S. Pat. No. 3 773 919), кополімери L-глутамінової кислоти та у етил- L-глутамату, етилен-вініл ацетат, що не розкладається, сополімер молочної кислоти/лінолеїнової кислоти, що розкладається, та леупролід ацетат), та полі-D-(-)-3-гідромасляна кислота.

Форми, що призначені для введення *in vivo*, мають бути стерильними. Це досягається фільтрацією через стерильні фільтраційні мембрани.

V. Лікування та дозування антитіл до HER

Приклади різних видів раку, що їх можна лікувати фіксованими дозами антитіла до HER, перелічені у розділі «визначення» вище. Даний винахід

бажано застосовувати за видів раку, що включають рак яєчника, перитонеальний рак, рак фолікулярної труби, рак молочної залози, включаючи метастазуючий рак молочної залози (MBC); рак легень, включаючи недрібноклітинну карциному легень (NSCLC), рак простати, рак кишечника та/або рак, що проявляє HER експресію, ампліфікацію та/або активацію. В одному прикладі рак, що його лікують за цим способом, є резистентним до хіміотерапії або платинорезистентним раком. Уведення фіксованих(ої) доз(и) антитіл призведе до зменшення виразності симптоматики захворювання.

Окрім раку фіксована(і) доза(и) HER антитіл, як тут показано, можуть використовуватися для лікування різних незлоякісних захворювань та розладів. Такі не злоякісні захворювання або розлади включають аутоімунні захворювання (наприклад, псоріаз, див. визначення вище), ендометріоз, склеродермію, рестеноз, поліпи, такі як поліпи у товстому кишечнику, носові поліпи або гастроінтестинальні поліпи; фіброаденому; респіраторні захворювання (див. визначення вище); холецистит; нейрофіброматоз; полікістоз нирок; запальні захворювання; захворювання шкіри, включаючи псоріаз та дерматит; судинні захворювання (див. визначення вище); стани, що призводять до надмірної проліферації клітин судинного епітелію; виразок шлунково-кишкового тракту, захворювання Менетріє, синдром аденомних виділень або втрати білка; порушення функції нирок; ангіогенні порушення; захворювання очей, такі як вікова макулярна дегенерація, за припущенням синдром очного гістоплазмозу, неоваскуляризація ретини пов'язану з проліферативною діабетичною ретинопатією, васкуляризація сітківки, діабетична ретинопатія, або вікова дегенерація жовтої плями; патологічні стани, пов'язані з ураженням кісток, такі як остеоартрит, рахіт та остеопороз; ускладнення внаслідок ішемії мозку; фібрози або набрякові захворювання, такі як цироз печінки, фіброз легень, каркоїдоз, тиреоїдит, системний синдром гіперв'язкості, захворювання Озієр Вебер-Ренду, хронічна обструкційна хвороба легень або набряк внаслідок опіків, травми, опромінення, інсульту, гіпоксії або ішемії; гіперчутлива реакція шкіри; діабетична ретинопатія та діабетична нефропатія, синдром Гієна-Барре; реакція «трансплантат проти хазяїна» або відторгнення трансплантату; захворювання Педжета; запалення кісток або суглобів, фотостаріння (наприклад, шкіри людини, викликане У Ф випромінюванням); доброякісна гіпертрофія простати, деякі мікробні інфекції, включаючи мікробні патогени серед аденовірусів, hantaviruses, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. та *Bordetella pertussis*; тромбоз, що викликається агрегацією тромбоцитів, репродуктивні стани, такі як ендометріоз, синдром гіперстимуляції яєчників, прееклампсія, маточна дисфункціональна кровотеча або менометрорагія; синовіти, атерома, гострі та хронічні нефропатії (включаючи проліферативний гломерулонефрит та спричинене діабетом ниркове захворювання); екзема, гіпертрофічне утворення шраму; ендотоксичний шок та грибкова інфекція; родинний аденоматозний поліпоз; нейродегенеративні захворювання (наприклад захво-

рювання Альцгеймера, деменція, пов'язана зі СНІДом), захворювання Паркінсона, боковий аміотрофічний склероз, пігментація сітківки, спинальна м'язова атрофія та церебральна дегенерація); мієлодиспластичні синдроми, гіпопластична анемія; ішемічне ураження, фіброз легень, нирок або печінки; захворювання гіперчутливості, що опосередковані Т-клітинами; гіпертрофічний пілоростеноз немовлят; уринарний обструктивний синдром; псоріазний артрит та тиреоїдит Хасімото. Цю терапію бажано застосовувати за незлоякісних захворювань, що включають псоріаз, ендометріоз, склеродермію, захворювання судин (наприклад, рестеноз, атеросклероз, ішемічна хвороба серця або гіпертензія), поліпи товстої кишки, фіброаденома або респіраторні захворювання наприклад, астма, хронічний бронхіт, бронхоектазія або муковісцидоз).

Антитіло до HER вводиться хворій людині відповідно до відомих методів, таких як внутрішньовенне введення, наприклад, у вигляді болюсу або шляхом безперервної інфузії впродовж певного проміжку часу, внутрішньом'язово, інтраперитонеально, інтрацереброспинально, підшкірно, інтраартикулярно, інтрасиновіально, інтратекально, орально, місцево, або інгаляційним шляхом. Перевага надається внутрішньовенному введенню.

Фіксована доза антитіла до HER, призначеного для профілактики або лікування захворювання, залежатиме від типу захворювання, що підлягає лікуванню, як це зазначено вище, його тяжкості та перебігу, від того, як антитіло вводиться, попереднього лікування, історії хвороби та реакції на антитіло, а також вибору лікуючого лікаря. Фіксована доза відповідним чином вводиться хворому одноразово чи повторними серіями лікування. Бажано, щоб фіксована доза знаходилася в інтервалі від приблизно 20 мг до приблизно 2000 мг антитіла до HER. Наприклад, фіксована доза може складати близько 420 мг, близько 525 мг, близько 840 мг або близько 1050 мг антитіла до HER.

У разі, коли вводиться серія фіксованих доз, вони можуть, вводитися, приміром, приблизно щотижнево, приблизно кожні два тижні, приблизно кожні три тижня або приблизно кожні 4 тижня, але найкраще приблизно кожні 3 тижні. Уведення фіксованої дози може, наприклад, тривати доти, поки захворювання прогресує, до несприятливих випадків або до іншого часу, що визначається лікарем. Наприклад, може бути уведено від близько двох, трьох, чотирьох і аж до близько 17 або більшої кількості фіксованих доз.

В одному з прикладів, вводяться одна або більше ударних доз антитіла, за якими слідує одна або більше підтримуючих(а) доз(а) антитіла. В іншому прикладі хворому вводиться значна кількість таких самих фіксованих доз.

Відповідно до одного бажаного прикладу реалізації винаходу фіксована доза антитіла до HER (наприклад, пертузумаб), що вводиться, становить приблизно 840 мг (ударна доза), а за нею - одна або більше доз приблизно по 420 мг (підтримуючі дози). Підтримуючі дози бажано вводити приблизно кожні 3 тижні до досягнення загальної кількості від принаймні 2 доз до 17 або більше.

Відповідно до іншого бажаного прикладу реалізації винаходу одна або більше фіксованих доз приблизно по 105 мг HER антитіла (наприклад, пертузумаб) вводяться, наприклад, кожні 3 тижні. Відповідно до цього прикладу одна, дві або більше фіксованих доз вводяться, наприклад, до одного року (17 циклів), а у разі необхідності і більше.

В іншому прикладі фіксована доза приблизно 1050 мг антитіла до HER2 (наприклад, пертузумаб) вводиться як ударна доза, а за нею одна або більше підтримуючих доз приблизно по 525 мг антитіла. Відповідно до цього прикладу, близько одної, двох або більше підтримуючих доз можуть бути введені хворому кожні 3 тижні.

Таким чином, у даному винаході пропонується спосіб лікування раку у хворих людей, що включає введення принаймні одної фіксованої дози пертузумабу хворому, при цьому фіксована доза складає приблизно 420 мг, приблизно 525 мг, приблизно 840 мг або приблизно 1050 мг пертузумабу.

У випадку захворювання на рак, бажано, щоб хворого лікували комбінацією антитіла до HER та одного чи більше хіміотерапевтичного засобу(ів). Бажано, щоб принаймні один з хіміотерапевтичних засобів був антиметаболічним хіміотерапевтичним засобом, таким як гемцитабін. Комбіноване введення включає одночасно або паралельне введення з використанням окремих лікарських форм або одної фармацевтичної форми та послідовне введення у будь-якій послідовності, при чому бажано, щоб був проміжок часу коли обидва (або усі) діючі засоби одночасно виявляли біологічну дію. Отже, антиметаболічний хіміотерапевтичний засіб може бути уведений до або після введення антитіла до HER. У цьому прикладі бажано, щоб вибір часу між принаймні одним введенням антиметаболічного хіміотерапевтичного засобу та принаймні одним введенням антитіла до HER складав приблизно 1 місяць або менше, і найбільш бажано - приблизно 2 тижні або менше. Альтернативно, антиметаболічний хіміотерапевтичний засіб та антитіло до HER вводяться одночасно пацієнту як єдина лікарська форма або окремі форми. Лікування комбінацією хіміотерапевтичного засобу (наприклад, антиметаболічного хіміотерапевтичного засобу, такого як гемцитабін) та антитіла до HER (наприклад, пертузумабу) може призводити до синергічного, або більшого за адитивний, терапевтичного ефекту для хворого.

Антиметаболічний хіміотерапевтичний засіб, якщо він вводиться, звичайно використовується у відомих дозах або дозу можна зменшити завдяки комбінованій дії препаратів або через негативні побічні ефекти, що можна віднести до введення антиметаболічного хіміотерапевтичного засобу. Препарат та схеми дозування для таких хіміотерапевтичних засобів можуть використовуватися відповідно до інструкцій виробника або як це визначено емпірично досвідченим практиком. Якщо антиметаболічним хіміотерапевтичним засобом є гемцитабін, бажано щоб він вводився за доз від близько 600 мг/м^2 до 1250 мг/м^2 (наприклад, приблизно 1000 мг/м^2), наприклад, на 1 та 8 добу у 3 тижневому циклі.

Окрім використання антитіла до HER та анти-метаболічного хіміотерапевтичного засобу, можлива комбінація і з іншими терапевтичними схемами. Наприклад, другий (третій, четвертий і т.д.) хіміотерапевтичний засіб може уводитися, при цьому другий хіміотерапевтичний засіб є або іншим відмінним антиметаболічним хіміотерапевтичним засобом або хіміотерапевтичним засобом, що не є антиметаболічним. Наприклад, другий хіміотерапевтичний засіб може бути таксаном (таким як паклітаксел або доцетаксел), капецитабіном або хіміотерапевтичним засобом на основі платини (таким як карбоплатин, цисплатин або оксалплатин), антрацикліном (таким як доксорубіцин, включаючи ліпосомальний доксорубіцин), топотеканом, пеметрексом, алкалоїдом барвінку (таким як вінорелбін) та TLK 286. Можуть уводитися «коктейлі» різних хіміотерапевтичних агентів.

Інші лікарські засоби, що можуть застосовуватися у комбінації з антитілом до HER, можуть включати будь-який один або більше з наступних: друге, відмінне від антитіла до HER (наприклад, антитіло, що пригнічує ріст HER2, таке як трастузумаб, або антитіло до HER2, що викликає апоптоз HER2 клітин, що перебувають у стані надмірної експресії, таке як 7C2, 7F3 або їхні варіанти, адаптовані для людей); антитіло, спрямоване проти іншого асоційованого з пухлиною антигену, таке як EGFR, HER3, HER4; антигормональні хімічні сполуки, наприклад, така антиестрогенна сполука, як тамоксифен або інгібітор ароматази; кардіопротектор (для зменшення або запобігання будь-яким порушенням функції міокарда, пов'язаних з лікуванням); цитокін; спрямований на EGFR препарат (такий як TARCEVA7, IRESSA7 або цетуксимаб); антиангіогенний засіб (особливо, Бевацизумаб, що продається фірмою Genentech під торговим знаком AVASTIN J); інгібітор тирозинкінази; COX інгібітор (наприклад, COX-1 або COX-2 інгібітор; нестероїдальний протизапальний препарат целекоксиб (CELEBREX7); інгібітор фарнесилтрансферази (наприклад, Тініфарніб/ZARNESTRA7 R1 15777, що виробляється фірмою Johnson and Johnson або Лонафарніб SCH66336, що виробляється фірмою Schering-Plough); антитіло, що зв'язує карциноємбріональний білок CA 125, таке як Ореговомаб (MoAb B43.13); HER2 вакцина (така як HER2 Auto Vac вакцина від фірми Pharmexia, або APC8024 білкова вакцина від Dendreon або HER2 пептидна вакцина від GSK/Corixa); інша спрямована на HER терапія (наприклад, трастузумаб, цетуксимаб, гефітініб, ерлотиніб, C11033, GW2016 і т.ін.); Raf та/або Ras інгібітор (див., наприклад, WO 2003/86467); доксорубіцин HCl ліпосомна ін'єкція (DOXIL®); інгібітор топоізомерази I, такий як топо-текан, таксан; HER2 та EGFR дуальний інгібітор тирозинкінази, такий як лататиніб/GW572016; TLK286 (TELCYTA®); EMD-7200; лікарський засіб, що його використовують у разі нудоти, такий як антагоніст серотоніну, стероїд або бензодіазепін; лікарський засіб, що запобігає або лікує шкіряні висипи або стандартні акне терапії, включаючи антибіотики, що застосовуються місцево чи орально; жарознижувальні засоби, такі як ацетаміно-

фен, діфенідрамін або меперидін; фактор кровотворного росту і т.ін.

Для будь-якого зі згаданих вище засобів, що застосовуються разом, придатні ті дози, що на сьогодні використовуються і можуть бути зменшені завдяки комбінованій дії (синергізму) засобу та HER антитіла.

Окрім наведених вище терапевтичних схем, може бути застосовано хірургічне видалення ракових клітин та/або променева терапія.

Бажано, щоб антитіло, що уводиться було ізольованим антитілом. Проте, антитіло, що уводиться, може бути сполучене з цитотоксичним засобом. Бажано, щоб імунокон'югат та/або антиген, із яким він сполучений, потрапляв до клітини, сприяючи більшій терапевтичній ефективності імунокон'югату щодо знищення ракової клітини, до якої він приєднується. У бажаному варіанті цитотоксичний засіб, спрямований на порушення функції нуклеїнової кислоти у раковій клітині. Приклади таких цитотоксичних засобів включають мейтансиноїд, калхеміцин, рибонуклеазу та ДНК ендонуклеазу.

Окрім введення білка антигену хворому, у даному застосуванні введення антитіла або білкового інгібітору розглядаються як засоби генної терапії. Стосовно використання генної терапії для утворення внутрішньоклітинних антитіл див., наприклад, WO 96/07321, опубліковано 14 березня 1996 р.

Існують два головних підходи до доставки нуклеїнової кислоти (може міститися у векторі) до клітини хворого - *in vivo* та *ex vivo*. Для *in vivo* доставки нуклеїнова кислота уводиться безпосередньо хворому, звичайно, у місце, де необхідно антитіло. Для *ex vivo* лікування клітини хворого видаляються, нуклеїнова кислота уводиться у ці ізольовані клітини, і ці вже модифіковані клітини уводяться хворому або безпосередньо, або, наприклад, інкапсулюються в межах пористих мембран, які імплантуються хворому (див., наприклад, U.S. Patent Nos. 4 892 538 та 5 283 187). Існують різні методики для введення нуклеїнових кислот до життєздатних клітин. Ці методи відрізняються залежно від того, чи нуклеїнова кислота переноситься до культури клітин їхнього хазяїна *in vitro* чи *in vivo*. Методики, придатні для переносу нуклеїнової кислоти до клітин ссавців *in vitro* включають використання ліпосом, електропорації, мікроін'єкції, злиття клітин, DEAE- декстран, метод преципітації фосфату кальцію, та ін. Звичайно вектором, що використовується для доставки гена *ex vivo*, є ретровірус.

Методики переносу нуклеїнової кислоти *in vivo*, яким нині надається перевага, включають трансфекцію за допомогою вірусних векторів (такі як аденовірус, вірус Herpes simplex I або аде-ноасоційований вірус) та системи на основі ліпідів (придатними ліпідами для опосередкованого ліпідом переносу гена є, наприклад, DOTMA, DOPE та DC-Chol). У деяких ситуаціях бажано забезпечити джерело нуклеїнової кислоти агентом, спрямованим на клітини-мішені, таким як антитіло, що специфічне до мембранних білків на поверхні клітини або до клітини-мішені, ліганд специфічний до рецептора на клітині-мішені та ін. Якщо викорис-

товуються ліпосоми, білки, що зв'язуються з мембранними білками на поверхні клітини, які асоціюються з ендцитозом, можуть використовуватися для спрямування на мішень та/або полегшення надходження, наприклад, капсид-білки або їхні фрагменти, тропічні до певного типу клітин, антитіла тропічні до білків, що зазнають циклічної інтерналізації та білки, що спрямовані на внутрішньоклітинну локалізацію та збільшують внутрішньоклітинний період напіврозпаду. Методика ендцитозу, опосередкованого рецептором, описана, наприклад, Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); and Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Огляд відомих на цей час протоколів маркування генів та генної терапії див. Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Див. також WO 93/25673 та посилання, що там наведені.

VI. Вироби

У іншому прикладі реалізації винаходу використовується виріб, що містить матеріали корисні для лікування раку або інших порушень, що описані вище. Цей виріб складається з флакона з фіксованою дозою HER антитіла, що міститься в ній, та також, можливо, але не обов'язково, з листівкою-вкладишем. Цей флакон може бути виконаний з різноманітних матеріалів таких як скло або пластик і може бути закупорений пробкою, що її можна проткнути шприцом. Наприклад, флакон може бути стандартним скляним флаконом типу I (наприклад, флакон на 20 см³ для 420 мг фіксованої дози або флакон на 50 см³ для 1050 мг фіксованої дози) з DAIKYO GREY™ пробкою, ламінованою флуоро-смолою, та з 20 мм алюмінієвим ковпачком з відкидним верхом. Виріб також може включати інші матеріали, бажані з комерційної точки зору та точки зору споживача, включаючи інші буфери, розчинники, фільтри, голки, шприци і т. ін.

У бажаному прикладі реалізації виріб складається з флакону, що містить фіксовану дозу антитіла до HER (наприклад, пертузумаб), при цьому фіксована доза становить приблизно 420 мг, приблизно 525 мг, приблизно 840 мг або приблизно 1050 мг антитіла до HER.

Бажано також, щоб виріб містив листівку-вкладиш. Листівка-вкладиш може надавати інструкції з уведення фіксованої дози хворому на рак, включаючи, але не обмежуючись, хворого на рак яєчника, перитонеальний рак, рак фаллопієвої труби, метастатичний рак молочної залози (MBC), не дрібноклітинну карциному легень (NSCLC), рак простати, рак кишечника та/або для уведення фіксованої дози хворому на рак, за умови відсутності HER експресії, ампліфікації та/або фосфорилляції.

В одному прикладі, виріб складається з двох флаконів, при цьому перший флакон містить фіксовану дозу приблизно 840 мг пертузумабу, а другий флакон містить фіксовану дозу приблизно 420 мг пертузумабу.

В іншому прикладі виріб складається з двох флаконів, при цьому перший флакон містить фіксовану дозу приблизно 1050 мг пертузумабу, а другий флакон містить фіксовану дозу приблизно 525 мг пертузумабу.

VII. Депонування матеріалів

Наступні гібридомні лінії клітин були депоновані в Американській колекції типових культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

| Антитіло | № ATCC | Дата депозиту |
|----------|----------------|-----------------|
| 7C2 | ATCC HB-12215 | 17 жовтня, 1996 |
| 7F3 | ATCC HB-12216 | 17 жовтня, 1996 |
| 4D5 | ATCC CRL 10463 | 24 травня, 1990 |
| 2C4 | ATCC HB-12697 | 8 квітня, 1999 |

Подальші деталі винаходу ілюструються наступними Прикладами, що не обмежують. Розкриття усіх цитат у специфікації прямо включено сюди посиланням.

ПРИКЛАД 1

У цьому прикладі оцінюється популяційна фармакокінетика (ФК) та прогностичні випадкові перемінні для антитіла до HER пертузумаб та розглядається варіабельність стаціонарних найнижчих концентрацій у сироватці після фіксованого, на одиницю ваги тіла або на одиницю площі поверхні тіла способів дозування. Пертузумаб вводився внутрішньовенно (кожні 3 тижня) або з розрахунком дози на одиницю ваги (0,5-15 мг/кг), або як фіксованої дози (420 мг або 1050 мг). Дані концентрації пертузумабу, отримані за результатами одного клінічного випробування Іа фази та двох клінічних випробувань ІІ фази (рак яєчників та молочної залози) за участю 153 хворих і визначені у 1458 часових точках, були об'єднані за допомогою NONMEM™ з використанням методу умовного оцінювання першого порядку з Методом взаємодії (взаємодія FOCE). Ці дані найкращим чином описувалися лінійною двохкамерною моделлю. Маса тіла, концентрація альбуміну у сироватці та активності лужної фосфатази у сироватці визначені як значущі перемінні, що впливали на кліренс (CL), а площа поверхні тіла (ППТ) була значущою перемінною, що впливала на розподіл об'єму у центральній камері (Vc). В остаточній моделі CL та Vc складали 0,214 л/доба та 2,74 л, відповідно. Вага пояснювала лише 8,3 % варіабельності CL, пов'язаної з індивідуальними відмінностями хворих. Оцінка остаточної популяційної ФК моделі з використанням апостеріорної прогностичної перевірки показала добрий результат. У порівнянні з фіксованим дозуванням дозування на одиницю ваги та одиницю ППТ лише зменшувало популяційну варіабельність стаціонарних найнижчих концентрацій на 6,2 % та 5,8 %, відповідно, у 1000 моделях хворих, побудованих на основі оригінальних даних за методом бутстреп з використанням остаточної моделі. Створені моделі також показали, що відсоток суб'єктів з прогнозованими стаціонарними найнижчими концентраціями, меншими за необхідну, що становила 20 мкг/мл, були подібними у разі фіксованого, на одиницю ваги чи одиницю ППТ дозування. Аналіз, проведений у цьому прикладі, дає підстави для висновку, що хоча адаптовані для людей антитіла звичайно дозуються на одиницю ваги, уведення антитіла до HER пертузумаб для лікування раку бажано проводити з використанням фіксованої дози.

СПОСОБИ

Дослідження та хворі

Усі дослідження, застосовані у цьому аналізі, були затверджені відповідними комітетами з етики медичних центрів, що брали участь у цих дослідженнях. Усіх хворих було ознайомлено з формою інформованої згоди на участь у випробуваннях і отримано їх письмову згоду.

Дослідженням 1 була фаза Ia, відкритого (як дослідник, так і хворий, що брали участь у дослідженні, знають про лікування, що проводиться) і проведеного у кількох медичних центрах дослідження із збільшенням дози з метою оцінки безпеки, переносимості та фармакокінетичних профілей пертузумабу за умови внутрішньовенного введення як єдиного засобу суб'єктам з солідними злоякісними утвореннями на пізніх стадіях хвороби. Ці хворі отримували дозу пертузумабу, що вводилася внутрішньовенно кожні 3 тижні шляхом 90 хвилинної інфузії на 1-у цикл і 30 хвилинної інфузії у наступних циклах. Дози збільшувалися (0,5; 2; 5; 10 та 15 мг/кг) в групах від 3 до 6 суб'єктів доти, поки не була визначена максимальна доза, яку переносили хворі (MTD), або не було досягнуто максимального дозового рівня. Впродовж першого циклу лікування проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися у послідовних часових точках: перед дозою, наприкінці внутрішньовенної інфузії, за 1,5; 4 та 9 годин та на 2, 5, 8 та 15 добу. Під час другого циклу лікування проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися перед дозою, за 29 хвилин після початку внутрішньовенної інфузії та на 8-у добу.

Дослідження 2 було фазою II відкритих що проводилися «одними руками» в кількох медичних центрах випробувань для оцінки загальної ефективності, безпеки, толерантності та впливу основаної на пухлині HER2 активації на ефективність пертузумабу у пацієнтів на пізніх стадіях раку яєчника, за умов резистентності захворювання до попередньої хіміотерапії або рецидивів після неї. Ці жінки отримували внутрішньовенно пертузумаб, що вводився як єдиний засіб впродовж 90 хвилинного періоду під час 1-го циклу лікування за фіксованої дози у 840 мг, за якою слідувала підтримуюча доза в 420 мг, що давалася як 30 хвилинної інфузії кожні 3 тижня впродовж наступних циклів лікування. Під час першого та другого циклів лікування проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися до дози, за 15 хвилин після кінці інфузії та на 8 і 15 добу. Додаткові проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися до дози та за 15 хвилин після закінчення внутрішньовенної інфузії під час наступних циклів лікування.

Дослідження 3 було фазою II відкритого що проводилися «одними руками» у кількох медичних центрах рандомізованого дослідження з метою оцінки ефективності та безпечності двох різних доз пертузумабу, що вводилися як єдиний лікарський засіб хворим з метастатичним раком молочної залози з низькою експресією HER2. У першій групі хворі отримували пертузумаб як внутрішньовенну інфузію, що спочатку проводилася впродовж 90 хвилинного періоду як 840 мг ударна доза у 1-у

циклі, і з підтримуючою дозою у 420 мг, що вводилася кожні 3 тижня як 30 хвилинні внутрішньовенні інфузії, впродовж наступних циклів лікування. У другій групі хворі отримували внутрішньовенну інфузію пертузумабу як 1050 мг дозу впродовж 90-хвилинного періоду у 1-ому циклі та 1050 мг дозу як 30-хвилинну внутрішньовенну інфузію кожні 3 тижня впродовж наступних циклів лікування. У 3-у дослідженні проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися до введення дози, за 15 хвилин після закінчення інфузії та на 8 та 15 добу під час перших двох циклів лікування. Додаткові проби сироватки для визначення концентрацій пертузумабу відбиралися до введення дози та за 15 хвилин після закінчення інфузії під час наступних циклів лікування.

Аналіз препаратів

Концентрації пертузумабу у сироватці визначалися з використанням прийнятого рецептор зв'язувального, твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Цей аналіз використовував p185HER2 зовнішньоклітинний домен для захвату пертузумабу з проб сироватки. Зв'язаний пертузумаб виявляли за допомогою мишачих антитіл до Fc пероксидази хрому (HRP) людини (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) та тетраметил бензидину (TMB) (KPL, Inc.) використовувався як субстрат для появи кольору для кількісного визначення пертузумабу в сироватці. Мінімальна концентрація, що визначається цим аналізом становить 0,25 мкг/мл пертузумабу в сироватці людини.

Популяційний фармакокінетичний аналіз

Популяційне нелінійне моделювання змішаних ефектів виконувалося за допомогою NONMEM™ (Інструкція користувача Vоеckmann and Beal NONMEM™, Сан-Франциско: NONMEM™ Проектна група, Університет шт. Каліфорнія, Сан-Франциско (1994)) комп'ютерна програма (версія V, Рівень 1.0) з NM-TRAN та PREDPP та фортран компілятор, Compaq Visual Fortran compiler (версія 6.5). Дві різні основні структурні моделі як одно та двох-камерної лінійної ФК моделі з внутрішньовенною інфузією підганялися до даних концентрації пертузумабу у сироватці за відповідних часових точок. У процедурі побудови моделі використовувався метод умовного оцінювання першого порядку (FOCE) з η-ε взаємодією.

Для описання міжіндивідуальної варіабельності ФК параметрів використовували експоненціальну модель помилок:

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

Мультиплікативна коваріантна регресійна модель застосовувалася у наступному вигляді:

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

де η_{ip} позначає пропорційну різницю між «вирішувальними» параметрами (P_i) для i -го окремого хворого та типовим значенням (\hat{P}_i) в популяції, уточнену з урахуванням значень випадкових перемінних, рівних значенням у цих окремих хворих. η_{ip} - це випадковий ефект з середнім значенням, що дорівнює нулю та дисперсією ω^2 . θ_X та θ_D - коефіцієнти регресії, що мають бути визначені для неперервних (наприклад, ВАГА) або дискретних (напри-

клад, СТАТЬ та RACA) випадкових перемінних, відповідно. Неперервні перемінні розташовувалися з центром, що відповідав їхньому медіанному значенню ($\text{med}(X)$) таким чином, що θ_1 - оціночне значення кліренсу для типового хворого з медіанними значеннями випадкових перемінних. Дихотомічні випадкові перемінні кодувалися 0 або 1 (наприклад, СТАТЬ=0 для жінок, СТАТЬ=1 для чоловіків; RACA=0 для кавказької і RACA=1 для інших). Залишкову варіабельність моделювали як пропорційно-адитивну модель похибок:

$C_{rij} = \hat{C}_{rij}(1 + \varepsilon_{ij,prop}) + \varepsilon_{ij,add}$, де C_{ij} та \hat{C}_{rij} - j -і виміряні та розраховані за моделлю концентрації, відповідно, для 1-го індивідуума, а $\varepsilon_{ij,prop}$ та $\varepsilon_{ij,add}$ позначають пропорційний та адитивний залишок міжіндивідуальних випадкових похибок, що мають розподіл з середніми значеннями рівними нулю та дисперсіями σ_{prop}^2 та σ_{add}^2 .

Залежність між структурними розрахованими за моделлю Басівськими оцінками ФК параметрів та додатковими випадковими перемінними досліджувалася графічно. На основі попереднього пілотного аналізу оцінювалися ефекти кожної випадкової перемінної на параметри ФК. Спочатку розглядали вплив цих випадкових перемінних на окремі параметри ФК (наприклад, кліренс та об'єм центральної камери). Потім будували повну коваріантну модель для окремих параметрів ФК шляхом включення до моделі істотних випадкових перемінних. Зворотній процес вилучення було використано для визначення остаточної коваріантної моделі для кожного окремого параметра ФК, залишаючи в моделі лише істотні випадкові перемінні. У разі, якщо випадкові перемінні з високою кореляцією мали близькі фармакологічні значення (такі як вага та ППТ), в моделі залишали лише найбільш значущий фактор, і остаточно модель ФК конструювалася з використанням процедури зворотного вилучення.

Порівняння альтернативних структурних моделей та конструювання коваріантної моделі ґрунтувалося на типових тестах графічного оцінювання ступеня узгодження та відношенні правдоподібності. Порівняння альтернативних ієрархічних моделей показало, що різниці у значенні об'єктної функції мають приблизно хі-квадрат розподіл з n ступенями свободи (n - це різниця між кількістю параметрів у повній та редуцированій моделях). Було показано (Wahlby et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:231-52 (2001)), що це наближення є надійним для методу оцінки УОПП - взаємодії. Для того, щоб відрізнити дві ієрархічні моделі, використовували різницю між об'єктними функціями - більшу за 7,9 (1 ступінь свободи), що відповідає рівню значущості $p < 0,005$.

Частину міжіндивідуальної дисперсії (% дисперсії), що пояснюється у регресійній моделі для даних параметрів ФК (наприклад CL) випадковими перемінними, розраховували наступним чином:

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

де $\omega_{CL,BASED}^2$ та $\omega_{CL,FINAL}^2$ - міжіндивідуальна дисперсія кліренсу відповідно у базовій та остаточній моделі ФК.

Оцінка популяційної фармакокінетичної моделі

Для оцінки моделі з метою оцінки стабільності остаточної моделі та оцінки довірчих інтервалів параметрів у цьому дослідженні використовували методику повторної вибірки бутстрап. Ця методика оцінки моделі складається із створення набору даних з використанням бутстрепа опції у програмному пакеті Wings для NONMEM™ (N Holford, версія 404, червень 2003, Окленд, Нова Зеландія) з наступним отриманням оцінок параметрів для кожного з повторних наборів даних. Було отримано результати в 1000 послідовних прогонів і середні значення та 2,5 та 97,5 процентиля (що відповідають 95 % довірчому інтервалу) для популяційних параметрів і вони були порівняні з оцінками для оригінальних даних.

Окрім того, було використано апостеріорні прогностичні перевірки моделі для оцінки здатності остаточної моделі описувати дані, що спостерігаються (Yano et al. J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:171-92 (2001); German and Meng, Model checking and model improvement. B: Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ, eds. Markov Chain Monte Carlo in Practice. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 189-202 (1996); Gelman et al. Bayesian Data Analysis. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC (2004). У цьому аналізі було розраховано 2,5, 5, 10, 25, 50 (медіана), 75, 90 та 95 процентиля, і їх було вибрано для тестової статистики для постеріорної перевірки прогностичної моделі. Остаточна модель ФК, що включала остаточно фіксовані та випадкові параметри, була використана для моделювання 1000 повторів наборів даних спостережень. Для кожного з цих змодельованих наборів даних були розраховані статистичні оцінки. Після цього постеріорний прогностичний розподіл тестових статистик зі змодельованих наборів даних було порівняно з тестовими статистиками, отриманими для реальних хворих, р-значення (p^{PPC}) можуть бути оцінені шляхом розрахунку частини випадків, в яких тестові статистики зі змодельованого набору даних перевищують реалізовані значення тестових статистик для параметрів, одержаних у реальних хворих, відповідно до наступного рівняння (Gelman and Meng, (1996) див. вище), р-значення (p^{PPC}) можуть бути оцінені шляхом розрахунку частини випадків, в яких тестові статистики зі змодельованого набору даних перевищують реалізовані значення тестових статистик для параметрів, одержаних у реальних хворих, відповідно до наступного рівняння (Gelman and Meng, (1996) див. вище)

$$P^{PPC} = \frac{1}{N} \sum I(T(y_i^{rep}, \theta) \geq T(y, \theta_i)) \quad (1)$$

де $I(\cdot)$ - індикаторна функція, що приймає значення 1, якщо її аргумент «істина» та 0 в інших випадках. $T(y, \theta)$ - це «реалізоване значення» тестової статистики, що спостерігається тому що воно реалізується даними спостереження у. $T(y_i^{rep}, \theta)$ - це тестова статистика зі змодельованого набору

даних і (і приймає значення в діапазон від 1 до 1000) (Gelman and Meng, (1996) див. вище).

Окрім того, були розраховані 2,5, 5, 95 та 97,5 квантілі змодельованих даних для кожної часової точки для окремих хворих. Були визначені кількості фактичних даних, що потрапляють в межі 2,5 та 95,5 квантілей (95 % інтервал), 5 та 95 квантілей (90 % інтервал) об'єднаних змодельованих даних.

Вплив пертузумабу після фіксованого дозування та дозувань на одиницю ваги та одиницю ППТ

Остаточну популяційну модель ФК було використано для визначення стаціонарних найнижчих концентрацій пертузумабу та впливу на них фіксованих доз та доз розрахованих на одиницю ППТ та ваги тіла. Профілі залежності концентрації пертузумабу у сироватці від часу та кліренс пертузумабу для 1000 суб'єктів було змодельовано для фіксованого та розрахованого на одиницю ППТ та ваги тіла дозування з використанням остаточної моделі з набором даних, отриманих методом бутстрепінга (із заміною) оригінальних наборів даних

ФК. Усі модельні суб'єкти отримували внутрішньовенно 840 мг, 12,2 мг/кг або 485 мг/м² впродовж 90 хвилин на добу, а потім 420 мг, 6,1 мг/кг або 242,5 мг/кг впродовж 30 хвилин на 21, 42 та 63 добу. Потім оцінювалися стаціонарні найменші концентрації, отримані на 84 добу ($C_{SS\text{trough}}$) після різних схем дозування. Окрім того, розраховували відсоток суб'єктів зі стаціонарними найменшими концентраціями нижчими за цільову концентрацію (20 мкг/мл) після фіксованого або розрахованого на одиницю ППТ або маси дозування. Змодельовані значення кліренсу використовували для визначення стаціонарного середнього впливу $AUC_{SS_{0-\tau}}$

відповідно до наступного рівняння:

$$AUC_{SS_{0-\tau}} = \frac{\text{Dose}}{CL} \quad (4)$$

РЕЗУЛЬТАТИ

Демографічні дані. Демографічні характеристики хворих, включених до аналізу ФК, наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Демографічні характеристики
включених до аналізу хворих

| | Медіана | Діапазон |
|-----------------------------|---------|------------|
| Вік (роки) | 56.0 | 32.0-78.0 |
| ППТ*(м ²) | 1.73 | 1.40-2.53 |
| Вага (кг) | 69.0 | 45.0-150.6 |
| Альбумін (г/л) | 39.2 | 21.0-52.0 |
| Лужна фосфатаза (АБК)(МО/л) | 107.0 | 39.0-367.0 |
| Кількість хворих % | | |
| Стать | | |
| Чоловіча | 8 | 5.2 |
| Жіноча | 145 | 94.8 |
| Раса | | |
| Кавказька | 141 | 92.2 |
| Афро-американська | 3 | 2.0 |
| Латиноамериканська | 4 | 2.6 |
| Азійська | 3 | 2.0 |
| Індійські аборигени | 0 | 0 |
| Інша | 2 | 13 |

*ППТ, площа поверхні тіла.

Усього було отримано 1458 значень концентрації пертузумабу у різні часові точки від 153 хворих у трьох дослідженнях. Загалом, 18 хворих були з фази Іа випробовування, 60 - з фази ІІ випробовування з захворюванням на рак яєчника та 75 - з фази ІІ випробовувань з захворюванням на рак молочної залози. Таким чином, більшість (94.8 %) хворих, що приймали участь у цьому дослідженні, були жінками та за їх рахунок було отримано 1110 (76 %) значень концентрації пертузумабу у сироватці крові.

Усі суб'єкти мали пухлини з низькою експресією HER2, що підтверджувалося FISH (флуоресцентна in situ гібридизація) аналізом, і мали гарний фізичний функціональний стан, на що вказував статус

показників ECOG (Східна кооперативна онкологічна група), що дорівнював 0 або 1. Кількість хворих з відсутніми випадковими перемінними була дуже низькою (4,6 % як для ваги тіла, так і для ППТ), і у цих випадках відсутнім випадковим перемінним були приписані медіанні значення. Для 384 (20,8 %) значень концентрації пертузумабу у сироватці, для яких виявився зафіксованим лише день їх отримання, часом отримання вважали 12 годину дня. Аналіз на чутливість, проведений для оцінки впливу цих приписаних значень часу на оцінку популяційних параметрів в моделі, показав відсутність значущого впливу.

Популяційний аналіз ФК. З використанням зміни об'єктної функції (=736,2) та діагностичних

графіків було встановлено, що двохкамерна модель описувала отримані дані краще за однокамерну модель. Відповідність репрезентативного профілю залежності концентрації пертузумабу від часу для одно- та двохкамерної моделі показана на Фігурах 9А-В. Член, що описує міжіндивідуальну варіабельність (η) у K12 було вилучено з двохкамерної моделі, оскільки вилучення цього η члена не призводило до статистично значимого збільшення ($\eta < 7.88$) об'єктної функції. Отже, лише η_{CL} , η_{VC} та η_{K21} були залишені в остаточній базовій моделі.

Після цього оцінювали вплив присутності коваріантного члена серед η_{CL} , η_{VC} та η_{K21} . Включення коваріантних членів серед η_{CL} , η_{VC} та η_{K21} покращувало відповідність отриманим даним ($\delta = -23,2$, $df=3$). Проте, виявилося, що коваріантні члени погано оцінюються ($\%CV > 100$), мають малу оціночну кореляцію ($r_{CL-VC}=0,37$; $r_{CL-K21}=0,27$; $r_{VC-K21}=0,42$) та мають невеликий вплив на оцінки параметрів (дані не показані). Тому коваріантні члени не залишили для конструювання моделі ефектів випадкових перемінних. У пілотному аналізі з використанням базової моделі не було знайдено помітного зв'язку між потенційними випадковими перемінними та η_{K21} . Тому під час побудови остаточної моделі з випадковими перемінними їх вплив на η_{K21} не досліджувався.

На Фігурах 10А-В наведені графіки залежності прогнозованих за остаточною моделлю з випадковими перемінними значень концентрацій пертузумабу від реально отриманих, а також наведені

зважені різниці в залежності від прогнозованої концентрації пертузумабу в сироватці. У остаточній моделі сироватковий альбумін (ALB), вага тіла (BW) та сироваткова лужна фосфатаза (ALKP) виявилися найбільш значущими випадковими перемінними, що пояснюють міжіндивідуальну варіабельність кліренсу (CL) пертузумабу. ППТ була найбільш значущою випадковою перемінною, що пояснювала міжіндивідуальну варіабельність об'єму центральної камери (V_c) розподілу пертузумабу. Включення коваріантних членів серед η_{CL} , η_{VC} та η_{K21} покращувало відповідність оригінальним даним ($\delta = -14,0$, $df=3$). Проте, оціночна кореляція була невеликою ($r_{CL-VC}=0,45$; $r_{CL-K21}=0,28$; $r_{VC-K21}=0,39$), а оцінки параметрів не змінювалися, (дані не показані). Отже, коваріантні члени не були включені до остаточної моделі. Остаточна модель мала наступний вигляд:

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

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

Оцінки параметрів остаточної моделі зведені в Таблиці 3.

Таблиця 3

Оцінки параметрів остаточної популяційної фармакокінетичної моделі та стабільності параметрів з використанням процедури перевірки достовірності бутстреп

| | Оригінальний набір даних | 1000 повторів, отриманих за методом бутстреп |
|--|-----------------------------|--|
| | Оцінка (% RSE) ^a | Середнє значення (95 % довірчий інтервал) |
| Структура моделі | | |
| CL Л /доба) | 0,214(3,1) | 0,214(0,201; 0,228) |
| V_c (Л) | 2,740(1,9) | 2,739(2,640; 2,840) |
| K12 (доба ⁻¹) | 0,203(16,6) | 0,220(0,159; 0,416) |
| K21 (доба ⁻¹) | 0,258(15,6) | 0,275(0,203; 0,480) |
| Міжіндивідуальна варіабельність | | |
| 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) |
| Коваріантна 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 ($\theta_{ALKP-CL}$) | 0,169(29,5) | 0,170 (0,067; 0,258) |
| ППТ на V_c ($\theta_{PPIT-Vc}$) | 1,160(12,2) | 1,151 (0,890; 1,451) |
| Остаточна варіабельність | | |
| Пропорційна похибка σ^2_{prop} | 0,037 (19,4) | 0,037(0,030; 0,045) |
| Аддитивна похибка σ_{prop} , мкг/мл | 2,265 (77,8) | 2,24 (0,002; 4,160) |

a. %RSE: процентна відносна стандартна похибка оцінки = стандартна/оцінку параметра × 100

CL пертузумабу сироватки в популяційному аналізі було оцінено як 0,214 л/доба, а V_c стано-

вив 2,74 л. K12 та K21 становили 0,203 та 0,258 доба⁻¹, відповідно. Міжіндивідуальна варіабель-

ність для CL та Vc в остаточній моделі, розрахована як квадратний корінь інтеріндивідуумної дисперсії (ω^2) та виражений як % CV, складала 31,1 % та 16,2 %, відповідно, порівняно з 38,0 % та 20,8 % для базової моделі без випадкових перемінних. Таким чином, коваріантний вплив випадкових перемінних АЛБ, ВТ, та ЛФ в остаточній моделі, пояснював близько 33 % міжіндивідуальної варіабельності для CL. Проте, сама вага пояснювала лише 8,3 % міжіндивідуальної варіабельності для CL. Вплив випадкової перемінної ППТ пояснював близько 39 % міжіндивідуальної варіабельності Vc в остаточній моделі. Залежність CL від ВТ та Vc від ППТ у базовій моделі врахована в остаточній моделі як показано на Фіг. 11А-В. Оцінені значення для tma та ti^{up} складали 1,4 та 17,2 доби, відповідно.

Оцінка моделі. З оригінального набору даних було отримано 1000 послідовних прогонів методом бутстреп та порівняно з оригінальними даними, що спостерігалися. Оцінки середніх популяційних значень, отримані за процедурою бутстреп було порівняно з оригінальними даними, що спостерігалися. Оцінки середніх популяційних значень ФК, отриманих за допомогою процедури бутстреп, були подібні до оцінок параметрів оригінального набору даних (Таблиця 3). Це вказує на те, що розроблена модель була стабільною. 95 % довірчі інтервали для параметрів фіксованих ефектів були вузькими, що вказує на гарну точність.

Апостеріорну перевірку прогностичної моделі було використано для оцінки здатності остаточної моделі описувати дані, що спостерігалися. Оста-

точну популяційну фармакокінетичну модель, включаючи остаточні фіксовані та випадкові параметри, було використано для моделювання 1000 повторів. Потім було розраховано тестові статистики для кожного з 1000 змодельованих наборів даних. Фіг. 12А-Е показують гістограми 1000 змодельованих значень обраних тестових статистик з «реалізованим значенням» тестових статистик, що спостерігалися, вказаними вертикальними лініями. Апостеріорні прогностичні розподіли були близькими до величин, що спостерігалися з оціненими р-значеннями більшими, ніж 0,05 для кожної тестової статистики. Окрім того, відсотки концентрацій пертузумабу, що спостерігалися в межах 90 % та 95 % квантильних областей об'єднаних симульованих даних складали 89,3 % та 94,7 %, відповідно. Ці результати вказують на те, що ця модель здатна досить добре описувати та передбачати дані.

Вплив пертузумабу після фіксованого дозування та дозування на одиницю ППТ та ваги тіла

Прогнозовані стаціонарні найнижчі концентрації пертузумабу у сироватці на 84 добу ($C_{ss, trough}$) було оцінено для 1000 змодельованих суб'єктів, що були отримані за методом бутстреп з оригінального набору ФК даних та остаточної моделі з використанням фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ, описаної в розділі способи. Ці дані показали, що у разі дозування на одиницю ваги та ППТ популяційна варіабельність $C_{ss, trough}$ зменшувалася на 6,17 % та 5,76 %, відповідно, при порівнянні з фіксованим дозуванням (Фіг. 13 та Табл. 4).

Таблиця 4

Прогнозовані стаціонарні найменші концентрації пертузумабу у сироватці (84 доба) після фіксованого та на одиницю ППТ та ваги тіла дозування для 1000 змодельованих суб'єктів, отриманих методом бутстреп з оригінального набору ФК даних за остаточною моделлю

| | Найнижча C _{ss} (мкг/мл), фіксована доза | Найнижча C _{ss} (мкг/мл) доза на одиницю ваги | Найнижча C _{ss} (мкг/мл) доза на одиницю ППТ |
|---|--|---|--|
| Мінімум | 2,68 | 2,39 | 2,54 |
| 5-а центиль | 16,56 | 16,32 | 16,86 |
| Медіана | 51,87 | 51,81 | 52,48 |
| Середнє значення | 56,37 | 56,08 | 56,44 |
| 95-а центиль | 115,38 | 110,46 | 112,14 |
| Максимум | 209,67 | 179,06 | 192,00 |
| % CV | 54,05 | 52,62 | 52,40 |
| Дисперсія | 928,21 | 870,93 | 874,71 |
| % зміни дисперсії порівняно з фіксованою дозою ^a | | -6,17 | -5,76 |
| Відсоток суб'єктів з C _{ss, trough} ≤ 20 мкг/мл | 8,3 | 8,7 | 8,3 |

^a Відсоток зміни дисперсії порівняно з фіксованою дозою розраховується відповідно до наступного рівняння:

$$\text{Відсоток зміни дисперсії} = \frac{\text{Дисперсія}_{\text{доза на одиницю ваги або ППТ}} - \text{Дисперсія}_{\text{фіксована доза}}}{\text{Дисперсія}_{\text{фіксована доза}}} \times 100$$

Відсотки суб'єктів із значенням $C_{ss, trough}$ нижчим за цільову концентрацію у сироватці, що становить

20 мкг/мл, були подібними зі значеннями 8,3 %, 8,7 % та 8,3 % для фіксованого дозування та дозуван-

ня на одиницю ваги або ППТ, відповідно (Таблиця 4). Схожі результати було отримано в результаті аналізу стаціонарного сироваткового пертузумабу $AUC_{ss0-\tau}$ для 1000 змодельованих суб'єктів, а дозування на одиницю ваги та ППТ лише зменшувало популяційну варіабельність на 2,2 % та 4,2 %, відповідно, у порівнянні з фіксованим дозуванням. Той самий змодельований набір даних було використано для визначення $C_{ss, trough}$ після фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ для популяції з екстремальною вагою (тобто, $BT < 10$ -го та > 90 -го процентиля) (Фіг. 14А-Б). Медіанне значення пертузумабу $C_{ss, trough}$ для популяції з вагою меншою ніж або рівною 10-у процентилю були 72,3 (діапазон: від 8,7 до 166,5), 52,8 (діапазон: від 6,8 до 125,7) та 63,2 (діапазон: від 7,8 до 150,1) мкг/мл для фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ, відповідно. Відсоток суб'єктів в популяції з $C_{ss, trough}$ нижче цільової концентрації 20 мкг/мл становили 5,4 %, 12,6 % та 9,0 % для фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ, відповідно. Медіанні значення пертузумабу $C_{ss, trough}$ для популяції з вагою більшою за або рівною 90-му процентилю становили 42,1 (діапазон: від 7,0 до 119,8), 62,8 (діапазон: від 14,4 до 167,3) та 52,9 (діапазон: від 10,2 до 133,3) мкг/мл для фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ, відповідно. Відсотки суб'єктів у цій популяції зі значенням $C_{ss, trough}$ нижчим за цільову концентрацію в сироватці в 20 мкг/мл були схожими, при чому величини складали 7,4 %, 2,8 % та 5,6 % для фіксованого дозування та дозування на одиницю ваги та ППТ, відповідно. Схожі результати було отримано для аналізу стаціонарної концентрації пертузумабу у сироватці $AUC_{ss0-\tau}$ для цих підгруп з 1000 змодельованих суб'єктів.

ОБГОВОРЕННЯ

Типово адаптовані до людини моноклональні антитіла IgG та цитотоксичні лікарські засоби, що мають невеликі молекули, в онкології вводилися в дозах, що розраховуються на одиницю ваги тіла (мг/кг) або одиницю ППТ. Пертузумаб пройшов тестування в клініці за фазою Ia випробовувань на хворих на рак на пізніх стадіях та за фазою II випробовувань на пацієнтах з раком яєчників, молочної залози, легень та простати. Пертузумаб дозувався на одиницю ваги (мг/кг) на фазі I випробовувань, а потім, на фазі II випробовувань, почали використовувати фіксовану дозу. Використовуючи демографічні дані та дані залежності концентрації пертузумабу у сироватці від часу після введення, отримані у цих трьох випробовуваннях, у цьому дослідженні було побудовано популяційну модель ФК з прогностичними випадковими незалежними перемінними для ФК пертузумабу. Потім ця модель використовувалася для аналізу стаціонарних концентрацій після фіксованого дозування пертузумабу та дозування на одиницю ваги та одиницю ППТ.

ФК пертузумабу, отримана в результаті цього аналізу була дуже подібною до тої, що повідомлялася для інших адаптованих для людей моноклональних IgG препаратів, які використовуються в онкології (Harris et al. Proc Am Soc Clin Oncol 21:488a (2002); Leyland-Jones et al. J Clin Oncol

21:3965-71 (2003); and Lu et al. Clin Pharmacol Ther 75:91 (2004)).

Лінійна 2-камерна лінійна ФК модель найкраще описує ці дані, а у остаточній моделі кліренс пертузумабу складав 0,214 л/доба. Типове значення V_c пертузумабу становило 2,74 л або приблизно 40мл/кг, що дорівнює об'єму плазми людини та узгоджується з величинами, що повідомлялися для інших моноклоніальних IgG препаратів (Harris et al. (2002), див. вище; та Lu et al. (2004), див. вище). На CL пертузумабу істотно впливали вага тіла та концентрації альбуміну та лужної фосфатази у сироватці, на величину V_c істотно впливала ППТ. Вплив статі на ФК пертузумабу не можна було оцінити, оскільки в дослідження була включена мала кількість суб'єктів чоловічої статі (5,2 %). Результати процедури бутстреп та апостеріорної перевірки моделі вказують на те, що остаточна модель була стабільною та здатною описувати та передбачати отримані дані досить добре.

Вплив ваги на CL та ППТ на V_c вказує на те, що пертузумаб може дозуватися на одиницю або ваги тіла або ППТ. Проте, коваріантний вплив одної ваги та одної ППТ в цій моделі пояснює лише біля 8,3 % та 40 % міжіндивідуального ефекту CL та V_c , відповідно. Це вказує на те, що якщо вага є предиктором CL, а ППТ - предиктором для V_c , вплив ваги та ППТ на концентрацію пертузумабу після дозування може піддаватися виміру, але його внесок не дуже великий.

Тому на наступному кроці оцінювався вплив різних способів дозування на впливи пертузумабу з використанням моделей. У 1000 суб'єктів, отриманих методом бутстреп з оригінального набору даних, було знайдено, що дозування на одиницю ваги або одиницю ППТ зменшує популяційну варіабельність змодельованих стаціонарних найнижчих концентрацій у сироватці на 84 добу лише на 6,2 % та 5,8 %, відповідно, при порівнянні з фіксованим дозуванням. Окрім того, відсоток суб'єктів з передбаченою стаціонарною найнижчою концентрацією у сироватці нижчою за цільову в 20 мкг/мл були близькими за усіх трьох способів дозування. Схожі результати було отримано в результаті аналізу підгрупи у популяції з екстремальною вагою тіла (тобто, вага < 10 -го та > 90 -го процентиля).

Отже, робиться висновок, що ФК пертузумабу пов'язана з вагою та ППТ. Проте, вага та ППТ пояснювали лише малий відсоток міжіндивідуальної варіабельності CL та V_c , а дозування на одиницю ваги та ППТ схоже не покращує передбачуваність стаціонарних концентрацій пертузумабу. Рекомендується застосовувати схеми з фіксованими дозами пертузумабу у хворих на рак.

Вважається, що даний винахід є першим розкриттям критичної оцінки впливу дозування на одиницю ваги та ППТ адаптованого до людини IgG моноклонального антитіла на стаціонарні концентрації у хворих на рак. Застосування однакового фіксованого дозування має кілька важливих медичних та економічних наслідків: i) менші витрати завдяки більшій продуктивності при виробництві, зберіганні та транспортуванні єдиної одиничної дози, ii) ефективне приготування єдиної дози у фармації та лікарнях без необхідності індивідуалі-

зації для хворих, iii) більша ефективність коли лікар прописує єдину одиницю дози та iv) менша імовірність того, що хворий отримає неправильну дозу через помилки розрахунку дози. Хоча пристосовані для людини антитіла типово дозуються на

одиницю ваги або ППТ, проведений тут аналіз показує можливість уведення антитіла до HER пертузумабу хворим на рак, використовуючи фіксовану дозу.

Список последовательностей

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

<120> ФІКСОВАНЕ ДОЗУВАННЯ АНТИТІЛ ДО HER

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність синтезована

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність синтезована

<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 |
| | | | 95 | Ala | Arg |
| | | | | Asn | Leu |
| | | | | 100 | Gly |
| | | | | | Pro |
| | | | | | Ser |
| | | | | | Phe |
| | | | | | Tyr |
| | | | | | 105 |

| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln |
| | | | | 110 | Gly |
| | | | | | Thr |
| | | | | | Leu |
| | | | | | Val |
| | | | | | 115 |
| | | | | | Thr |
| | | | | | Val |
| | | | | | Ser |
| | | | | | Ser |

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність синтезована

<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> Штучна послідовність

<220>
 <223> послідовність синтезована

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa є переважно D або S

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<400> 9

Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<400> 10

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
 5 10

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність синтезована

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa є переважно R або L

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa є переважно Y або E

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa є переважно T або S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

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

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність синтезована

<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 125 | Pro Ser Val Phe | Pro 130 | Leu Ala Pro Ser | Ser 135 |
| Lys Ser Thr Ser | Gly 140 | Gly Thr Ala Ala | Leu 145 | Gly Cys Leu Val | Lys 150 |
| Asp Tyr Phe Pro | Glu 155 | Pro Val Thr Val | Ser 160 | Trp Asn Ser Gly | Ala 165 |
| Leu Thr Ser Gly | Val 170 | His Thr Phe Pro | Ala 175 | Val Leu Gln Ser | Ser 180 |
| Gly Leu Tyr Ser | Leu 185 | Ser Ser Val Val | Thr 190 | Val Pro Ser Ser | Ser 195 |
| Leu Gly Thr Gln | Thr 200 | Tyr Ile Cys Asn | Val 205 | Asn His Lys Pro | Ser 210 |
| Asn Thr Lys Val | Asp 215 | Lys Lys Val Glu | Pro 220 | Lys Ser Cys Asp | Lys 225 |
| Thr His Thr Cys | Pro 230 | Pro Cys Pro Ala | Pro 235 | Glu Leu Leu Gly | Gly 240 |
| Pro Ser Val Phe | Leu 245 | Phe Pro Pro Lys | Pro 250 | Lys Asp Thr Leu | Met 255 |
| Ile Ser Arg Thr | Pro 260 | Glu Val Thr Cys | Val 265 | Val Val Asp Val | Ser 270 |
| His Glu Asp Pro | Glu 275 | Val Lys Phe Asn | Trp 280 | Tyr Val Asp Gly | Val 285 |
| Glu Val His Asn | Ala 290 | Lys Thr Lys Pro | Arg 295 | Glu Glu Gln Tyr | Asn 300 |
| Ser Thr Tyr Arg | Val 305 | Val Ser Val Leu | Thr 310 | Val Leu His Gln | Asp 315 |
| Trp Leu Asn Gly | Lys 320 | Glu Tyr Lys Cys | Lys 325 | Val Ser Asn Lys | Ala 330 |
| Leu Pro Ala Pro | Ile 335 | Glu Lys Thr Ile | Ser 340 | Lys Ala Lys Gly | Gln 345 |
| Pro Arg Glu Pro | Gln 350 | Val Tyr Thr Leu | Pro 355 | Pro Ser Arg Glu | Glu 360 |
| Met Thr Lys Asn | Gln 365 | Val Ser Leu Thr | Cys 370 | Leu Val Lys Gly | Phe 375 |
| Tyr Pro Ser Asp | Ile 380 | Ala Val Glu Trp | Glu 385 | Ser Asn Gly Gln | Pro 390 |
| Glu Asn Asn Tyr | Lys 395 | Thr Thr Pro Pro | Val 400 | Leu Asp Ser Asp | Gly 405 |
| Ser Phe Phe Leu | Tyr 410 | Ser Lys Leu Thr | Val 415 | Asp Lys Ser Arg | Trp 420 |
| Gln Gln Gly Asn | Val 425 | Phe Ser Cys Ser | Val 430 | Met His Glu Ala | Leu 435 |
| His Asn His Tyr | Thr 440 | Gln Lys Ser Leu | Ser 445 | Leu Ser Pro Gly | |

<211> 217
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<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> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність синтезована.

<400> 18

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 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 |
| Thr Ser Ala Asn Ile | Gln Glu Phe Ala Gly | Cys Lys Lys Ile Phe |
| | 20 | 25 |
| Gly Ser Leu Ala Phe | Leu Pro Glu Ser Phe | Asp Gly Asp Pro Ala |
| | 35 | 40 |
| Ser Asn Thr Ala Pro | Leu Gln Pro Glu Gln | Leu Gln Val Phe Glu |
| | 50 | 55 |
| Thr Leu Glu Glu Ile | Thr Gly Tyr Leu Tyr | Ile Ser Ala Trp Pro |
| | 65 | 70 |
| Asp Ser Leu Pro Asp | Leu Ser Val Phe Gln | Asn Leu Gln Val Ile |
| | 80 | 85 |
| Arg Gly Arg Ile Leu | His Asn Gly Ala Tyr | Ser Leu Thr Leu Gln |
| | 95 | 100 |
| Gly Leu Gly Ile Ser | Trp Leu Gly Leu Arg | Ser Leu Arg Glu Leu |
| | 110 | 115 |
| Gly Ser Gly Leu Ala | Leu Ile His His Asn | Thr His Leu Cys Phe |
| | 125 | 130 |
| Val His Thr Val Pro | Trp Asp Gln Leu Phe | Arg Asn Pro His Gln |
| | 140 | 145 |
| Ala Leu Leu His Thr | Ala Asn Arg Pro Glu | Asp Glu Cys Val Gly |
| | 155 | 160 |
| Glu Gly Leu Ala | | |

<210> 22
 <211> 142
 <212> PR1
 <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



ФІГ. 1

ЛЕГКИЙ ВАРИАБЕЛЬНЫЙ

| | 10 | 20 | 30 | 40 |
|--------|-------------------------|---------------|--------|-----|
| 2C4 | DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC | [KASQDVSIGVA] | WYQQRP | |
| | *** | ***** | * | * |
| 574 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | [KASQDVSIGVA] | WYQQKP | |
| | | * | ** | *** |
| hum κI | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC | [RASQISNYLA] | WYQQKP | |

| | 50 | 60 | 70 | 80 |
|--------|---------------------|-------------------------|----|----|
| 2C4 | GQSPKLLIY [SASYRYT] | GVPDRFTGSGSGTDFTTISSVQA | | |
| | ** | * | * | * |
| 574 | GKAPKLLIY [SASYRYT] | GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQF | | |
| | * | ***** | | |
| hum κI | GKAPKLLIY [AASSLES] | GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQF | | |

| | 90 | 100 | |
|--------|----------------------|--------------------------|---|
| 2C4 | EDLAVYYC [QQYYIYPYT] | FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1) | |
| | * | * | * |
| 574 | EDFATYYC [QQYYIYPYT] | FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3) | |
| | *** | * | |
| hum κI | EDFATYYC [QQYNSLPWT] | FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5) | |

ФИГ. 2А

ВАЖКИЙ ВАРИАБЕЛЬНЫЙ

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

| | 50 | a | 60 | 70 | 80 |
|---------|-------------------------------|-----------------|----|----|----|
| 2C4 | HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] | KASLTVDRSSRIVYM | | | |
| | * | * | * | * | * |
| 574 | PGKLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] | RFTLSVDRSKNTLYL | | | |
| | ***** | * | * | * | * |
| hum III | PGKLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] | RFTISRDNKNTLYL | | | |

| | 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

Амінокислотна послідовність легкого ланцюга Пертузумабу

1 10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIQVAWYQOKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYIYIPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

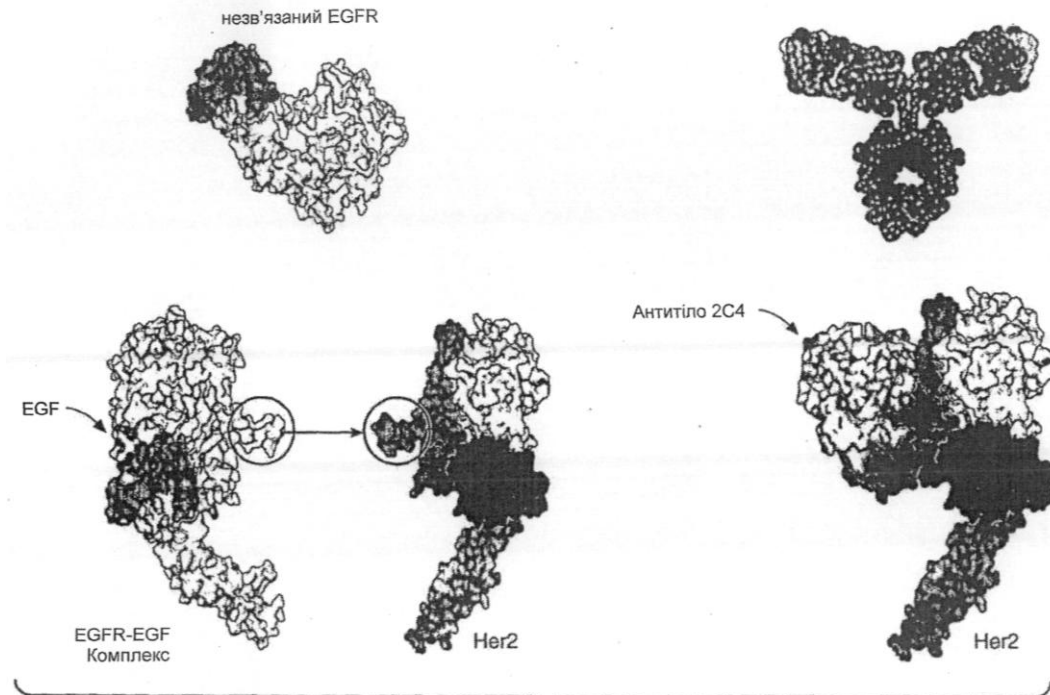
ФІГ. 3А

Амінокислотна послідовність важкого ланцюга Пертузумабу

1 10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY
 70 80 90 100 110 120
 NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTILTVSSA
 130 140 150 160 170 180
 STKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 190 200 210 220 230 240
 LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 250 260 270 280 290 300
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 310 320 330 340 350 360
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 370 380 390 400 410 420
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 430 440 448
 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

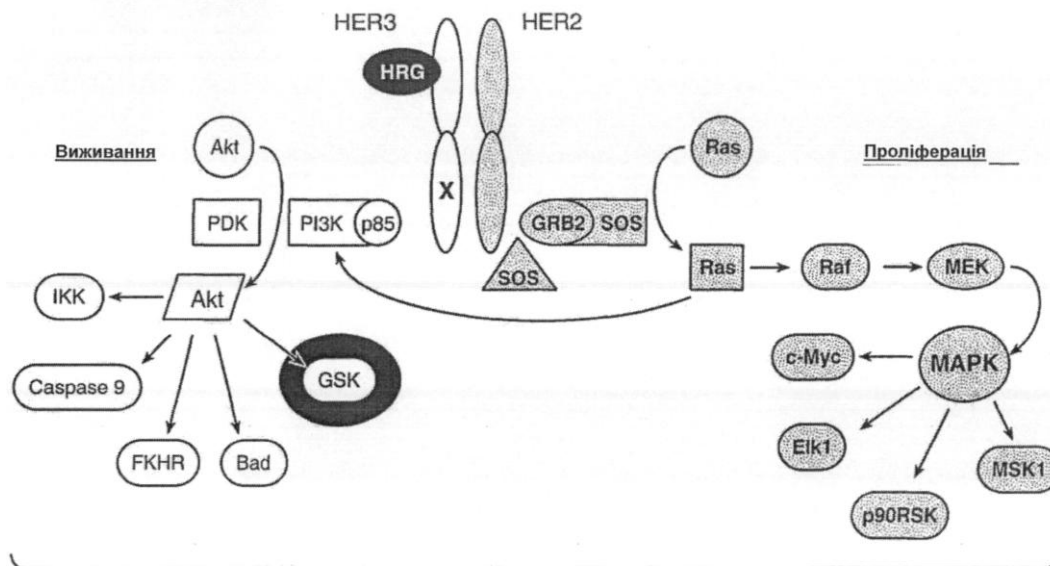
ФІГ. 3В

Гетеродимери ліганд-активованого EGFR зв'язуються з HER2 2C4 в сайті зв'язування гетеродимеру



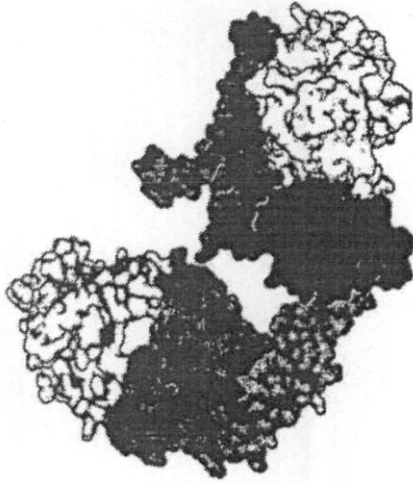
ФІГ. 4

Зв'язок HER2/3 із сигнальними шляхами MAPK та Akt



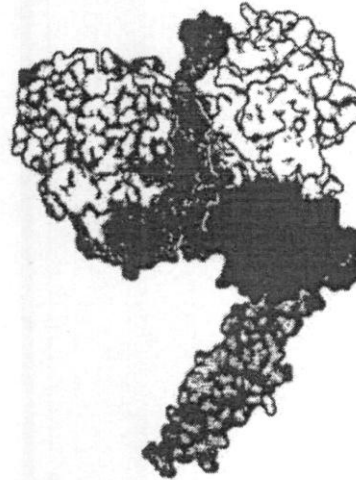
ФІГ. 5

Трастузумаб
Герцептин



- Зв'язування в IV поблизу JM.
- Захист після скидання рецептора
- Помірна дія на оборотну модуляцію рецептора
- Слабка дія на роль HER2 як корецептора

Пертузумаб
Омнітарг



- Зв'язування в II при димеризаційній взаємодії
- Не запобігає проти скидання рецептора
- Помірна дія на оборотну модуляцію рецептора
- Помірна дія на роль HER2 як корецептора

ФІГ. 6

ЛЕГКИЙ ЛАНЦЮГ

```

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

```

ФІГ. 7A

ВАЖКИЙ ЛАНЦИОГ

```

1      15      30      45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTNIKDTYIHWRQAPGKGL
46      60      75      90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91      105     120     135
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
136     150     165     180
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
181     195     210     225
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
226     240     255     270
THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
271     285     300     315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
316     330     345     360
WLVNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
361     375     390     405
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
406     420     435     449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHNTQKSLSLSPG

```

ФИГ. 7B

```

1      15      30      45
VHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGK
46      60      75      90
APKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYY
91      105     120     135
CQQYYIYPYTFGGQGTKEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
136     150     165     180
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
181     195     210     217
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

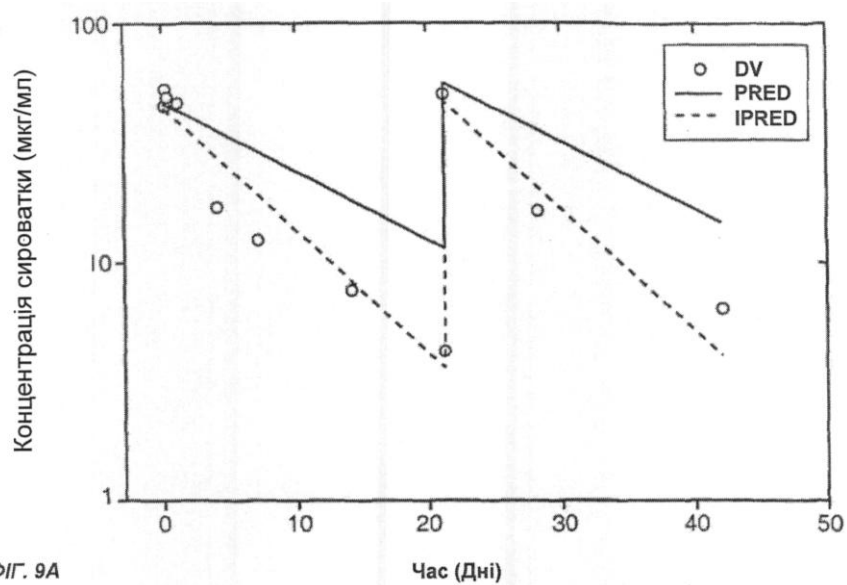
ФИГ. 8A

```

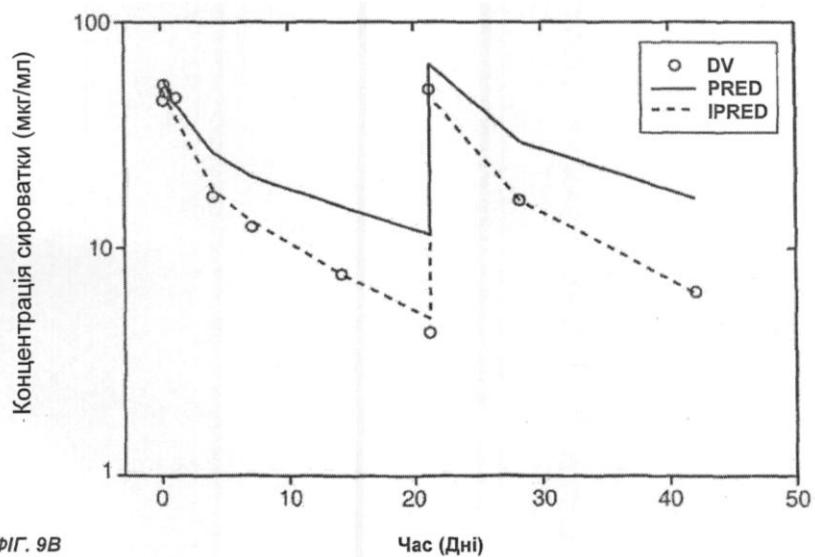
1      15      30      45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL
46      60      75      90
EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAED
91      105     120     135
TAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK
136     150     165     180
STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
181     195     210     225
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
226     240     255     270
HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
271     285     300     315
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSSTYRVVSVLTVLHQDW
316     330     345     360
LVNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
361     375     390     405
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
406     420     435     449
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHNTQKSLSLSPGK

```

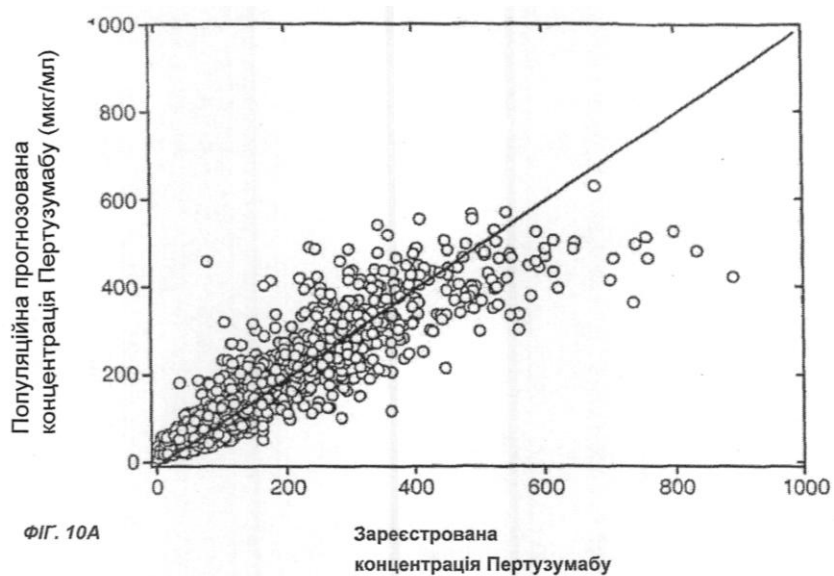
ФИГ. 8B



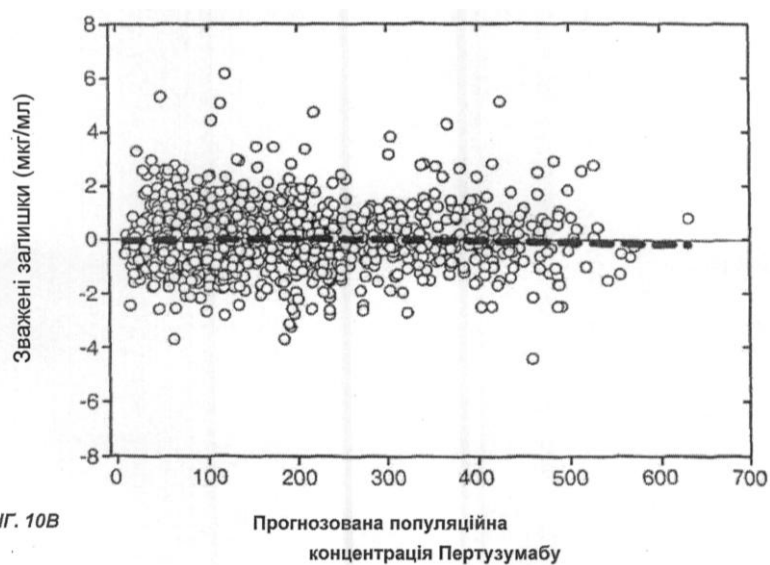
ФІГ. 9А



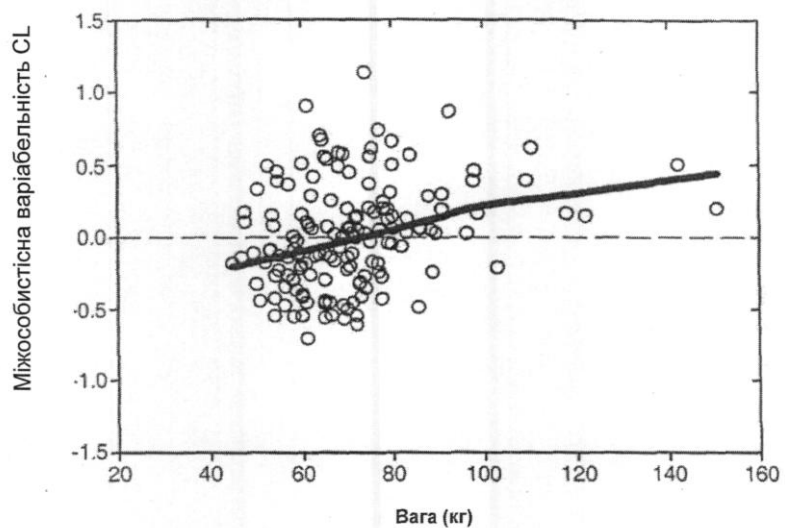
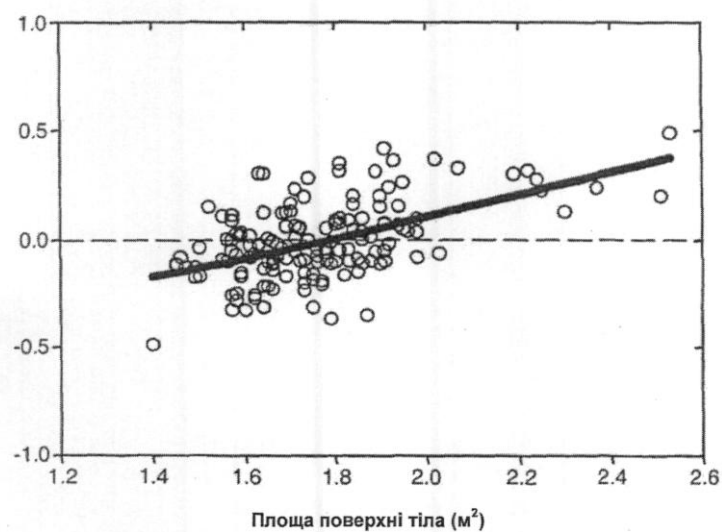
ФІГ. 9В



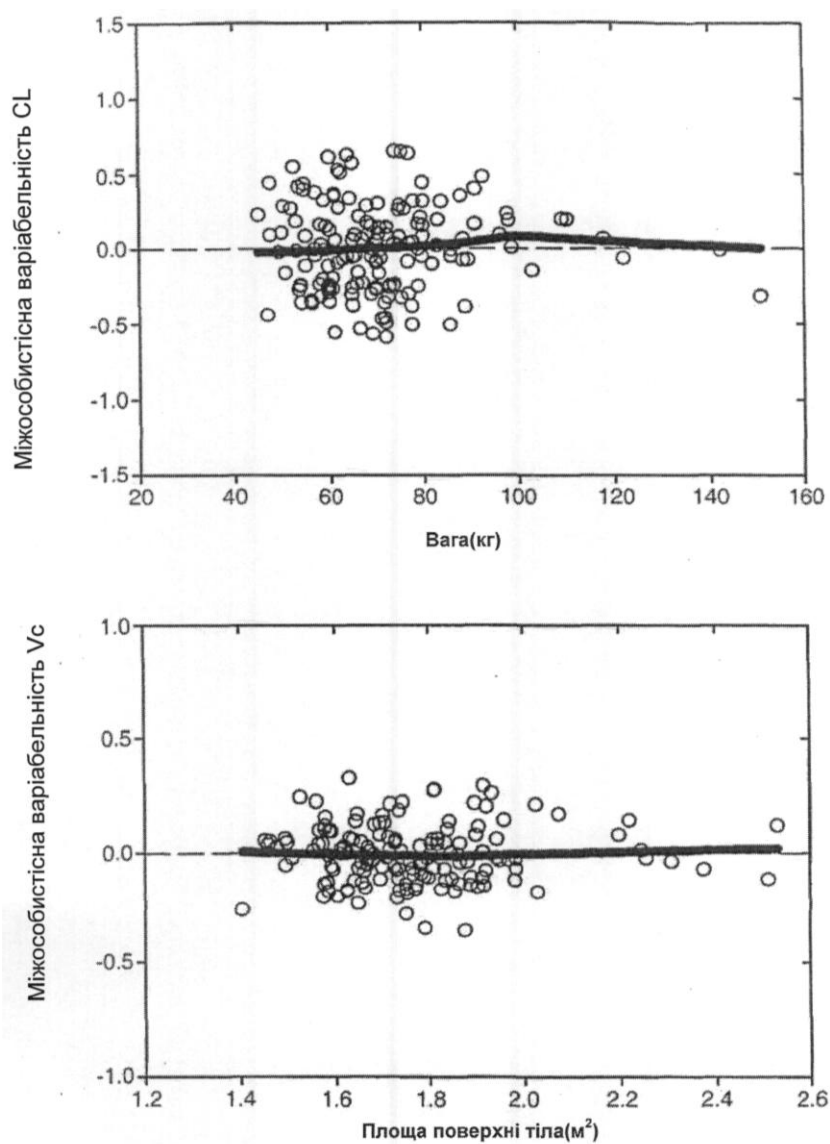
ФІГ. 10А



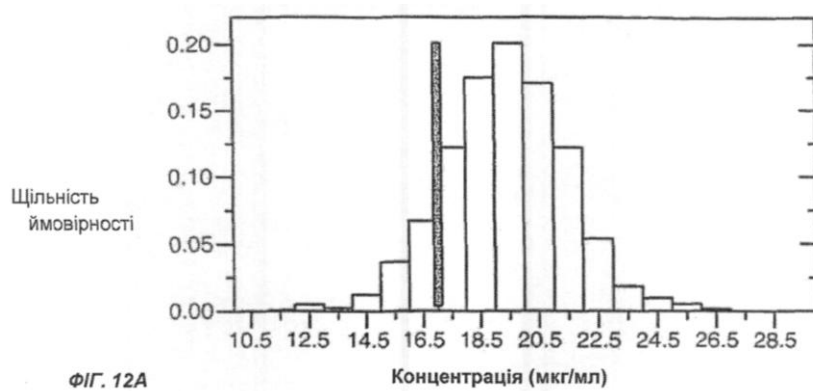
ФІГ. 10В

Міжособистісна варіабельність V_c 

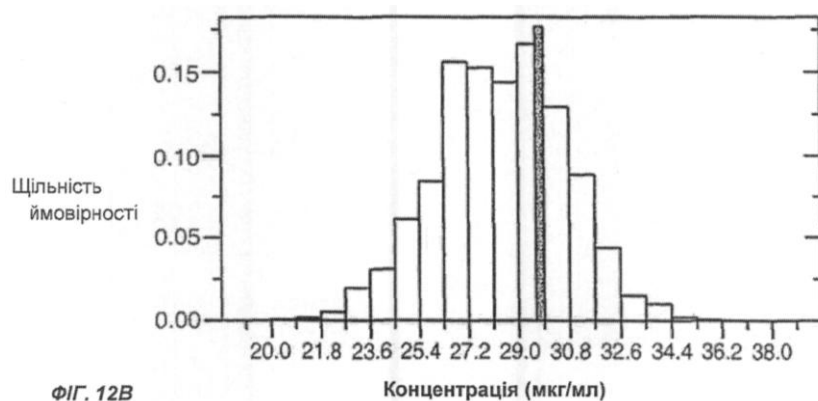
ФІГ. 11А



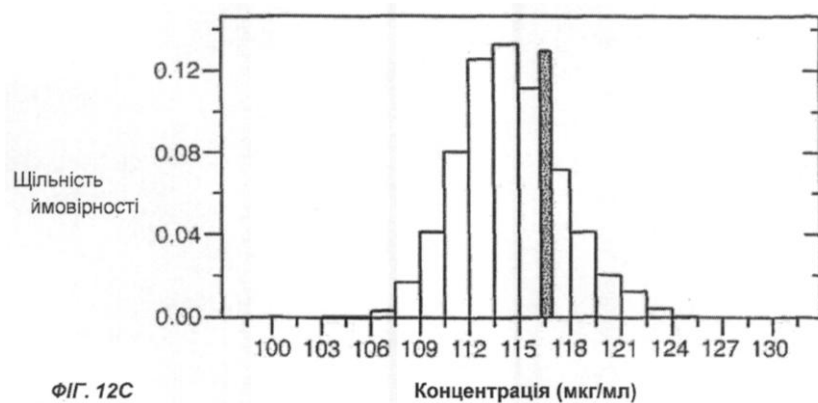
ФІГ. 11В



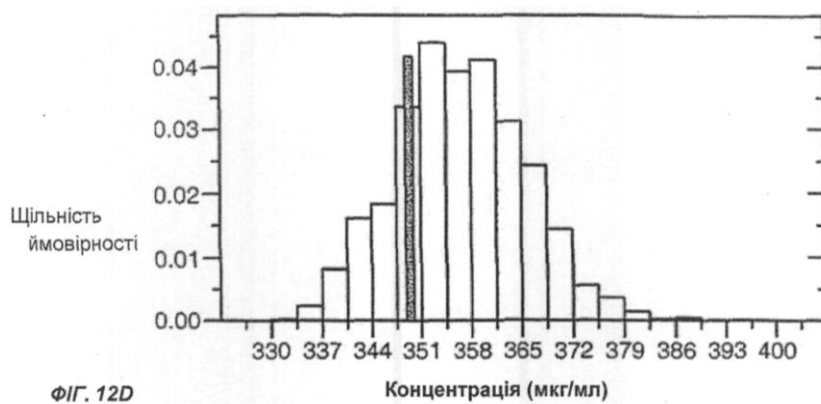
ФІГ. 12А



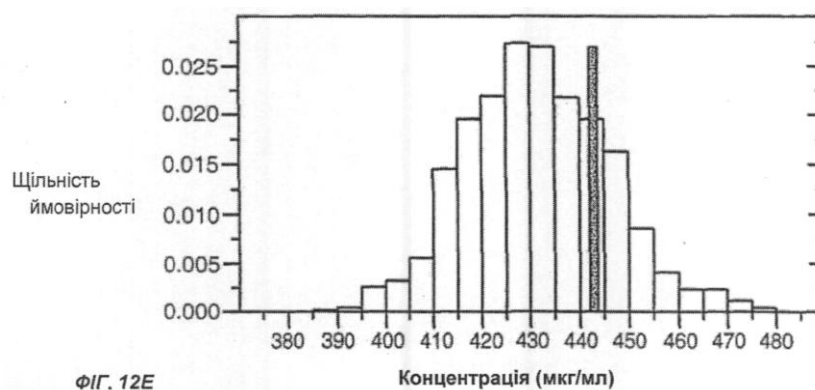
ФІГ. 12В



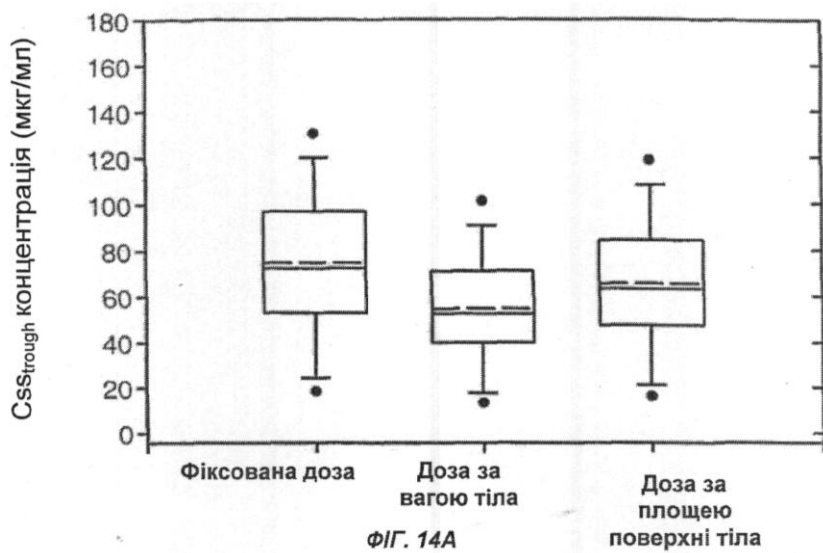
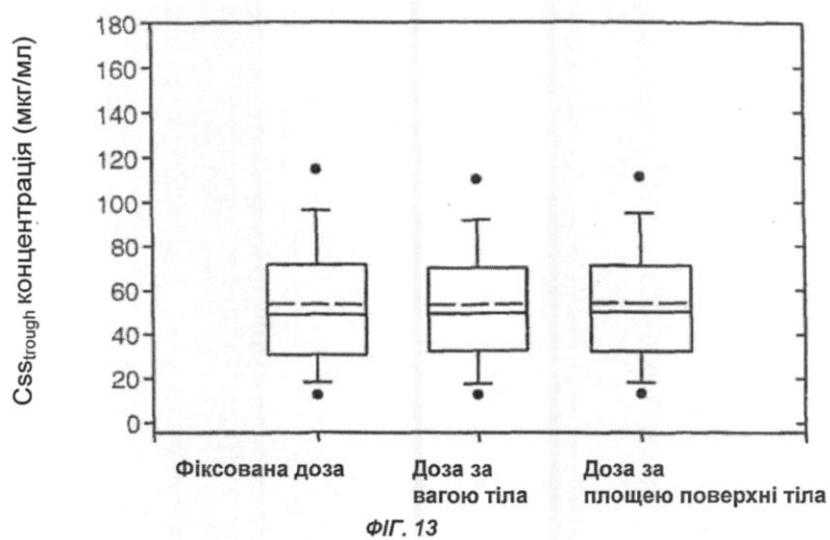
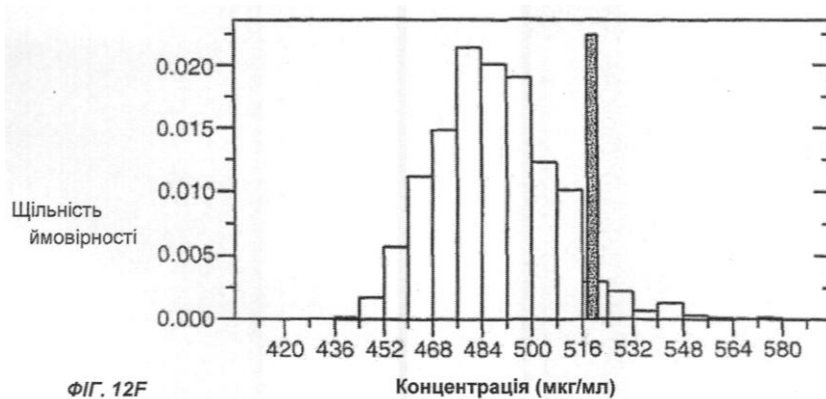
ФІГ. 12С

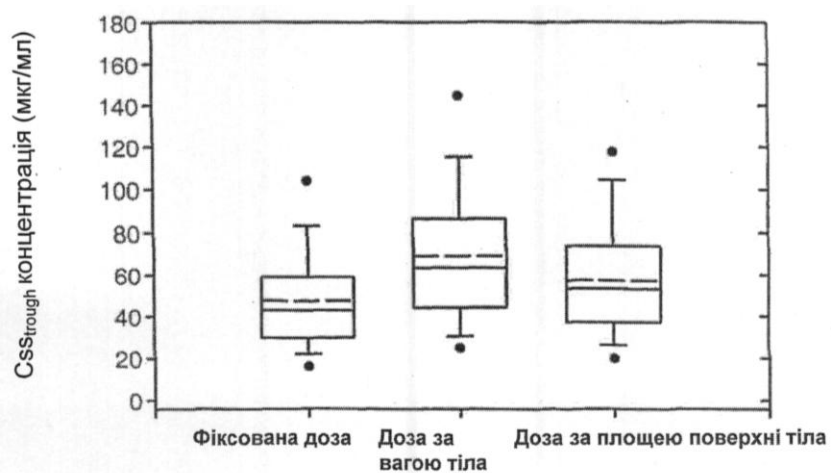


ФІГ. 12D



ФІГ. 12Е





ФІГ. 14В