



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99276** (13) **C2**  
(51) МПК (2012.01)

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00**  
**G01N 33/577** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2009 09492**  
(22) Дата подання заявки: **15.02.2008**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.08.2012**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **60/901,904, 61/009,796**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16.02.2007, 02.01.2008**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.01.2010, Бюл.№ 1**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.08.2012, Бюл.№ 15**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2008/002119, 15.02.2008**

(72) Винахідник(и):  
**Шоеберл Бірґіт (DE/US),  
Нільсен Ульрік (DK/US),  
Фелдхаус Майкл (US),  
Арумугам Муруганандам (CA/IN),  
Девід Баклер (US/US)**  
(73) Власник(и):  
**МЕРРИМАК ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК.,  
One Kendall Square, Building 700, 2nd Floor,  
Cambridge, MA 02139, United States of  
America (US)**  
(74) Представник:  
**Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
EP 1283053 A, 12.02.2003.  
WO 2006091209 A, 31.08.2006.  
WO 9735885 A, 02.10.1997.  
WO 2006017538 A, 16.02.2006.  
WO 2006020706 A, 23.02.2006.  
US 2003040605 A1, 27.02.2003.  
WO 2007077028 A, 12.07.2007.  
LOEE H ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FOUR ALTERNATE C-ERBB3 TRANSCRIPTS EXPRESSED IN OVARIAN CARCINOMA-DERIVED CELL LINES AND NORMAL HUMAN TISSUES" ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB BASINGSTOKE, HANTS, vol. 16, no. 25, 25 June 1998 (1998-06-25), pages 3243-3252, XP001087557 ISSN: 0950-9232.  
HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799.

UA 99276 C2

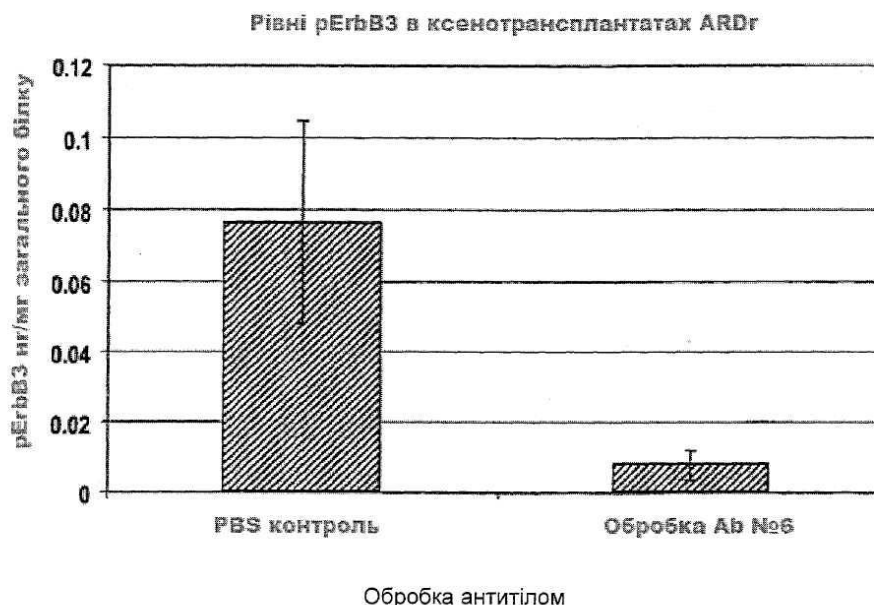
- (56) DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933.  
LITTLE M ET AL: "Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 8, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 364-370, XP004215163 ISSN: 0167-5699.  
BALINT R F ET AL: "ANTIBODY ENGINEERING BY PARSIMONIOUS MUTAGENESIS" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1, 27 December 1993 (1993-12-27), pages 109-118, XP002031537 ISSN: 0378-1119.

**(54) ВИДІЛЕНЕ МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З ErbB3, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до виділеного моноклонального антитіла, яке зв'язує ErbB3, гібридами, що його продукує, композиції, набору, способу пригнічення проведення сигналів ErbB3 у суб'єкта, способу лікування раку.

Антитіло Ab №6 пригнічує фосфориляцію ErbB3 в ксенотрансплантатах  
ADR<sub>r</sub> in vivo



**Fig. 12**

(PBS = забуферений фосфатом сольовий розчин)

Підродини ErbB/HER рецепторів поліпептидних факторів росту включає рецептор фактору епідермального росту (EGFR, ErbB1/HER1), новий продукт онкогену (ErbB2/HER2) та ідентифіковані пізніше рецепторні білки ErbB3/HER3 і ErbB4/HER4 (дивись, наприклад, Hynes et al. (1994) *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1198, 165-184). Кожний з цих рецепторів прогнозовано складається з позаклітинного домену, який зв'язує ліганд, домену, який натягує мембрану, домену цитозольної протеїнтирозинкінази (PTK) і домену С-термінальної фосфорилляції (дивись, наприклад, Kim et al., (1998) *Biochem. J.* 334, 189-195).

Експериментами *in vitro* було встановлено, що активність протеїнтирозинкінази білку ErbB3 є суттєво зниженою по відношенню до активності інших представників родини ErbB/HER, і цю знижену активність було приписано, частково, наявності неконсервативних амінокислотних заміщень в прогнозованому каталітичному домені ErbB3 (дивись, наприклад, Guy et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8132-8136; Sierke et al. (1997) *Biochem. J.* 322, 757-763). Однак було показано, що білок ErbB3 фосфорилується в дуже різних клітинних контекстах. Наприклад, ErbB3 конститутивно фосфорилується на тирозинових залишках в підгрупі клітинних ліній раку молочної залози людини, які з надлишком експресують цей білок (дивись, наприклад, Kraus et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2900-2904; і Kim et al. *Supra*; дивись також Schaefer et al. (2006) *Neoplasia* 8(7):613-22 та Schaefer et al. *Cancer Res* (2004) 64(10):3395-405).

Хоча роль ErbB3 у виникненні раку вже встановлено (дивись, наприклад, Horst et al. (2005) 115, 519-527; Xue et al. (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426), ErbB3 залишається в основному неоціненим в якості мішені для клінічного втручання. Сучасні способи імунотерапії фокусуються головним чином на пригніченні дії ErbB2 і, зокрема, гетеродимеризації комплексів ErbB2/ErbB3 (дивись, наприклад, Sliwowski et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994)). Відповідно, метою даного винаходу є вдосконалення імунотерапії в частині ефективного пригнічення сигнального шляху ErbB3, і він може бути використаний для лікування і діагностики різних видів раку.

Даний винахід стосується нового класу моноклональних антитіл, які зв'язуються з рецептором ErbB3 і пригнічують різні функції ErbB3. Наприклад, описані тут антитіла здатні зв'язуватись з ErbB3 і пригнічувати фосфорилляцію рецептору, опосередковану лігандом, подібним до епідермального фактору росту (EGF). Як тут описується, EGF-подібні ліганди включають EGF, TGF- $\alpha$ , бетацелулін, епідермальний фактор росту, що зв'язує гепарин, бірегулін і амфірегулін, які зв'язуються з EGFR і індують димеризацію EGFR під дією ErbB3. Ця димеризація, в свою чергу, викликає фосфорилляцію ErbB3 і активує проведення сигналів через цей рецептор. Отже, моноклональні антитіла за цим винаходом можуть бути використані для лікування і діагностики різних видів раку, що асоціюються з опосередкованим ErbB3 клітинним проведенням сигналів. Відповідно, в одному з варіантів здійснення, даний винахід стосується моноклональних антитіл (та їх частин, що зв'язують антиген), які зв'язуються з ErbB3 і пригнічують опосередковану EGF-подібним лігандом фосфорилляцію ErbB3.

В іншому варіанті здійснення ці антитіла додатково характеризуються однією чи більше з наступних властивостей: (i) здатністю пригнічувати опосередковане лігандом ErbB3 проведення сигналів, включаючи проведення сигналів, опосередковане зв'язуванням лігандів ErbB3, таких як херегулін, епірегулін, епігон і BIR, з ErbB3; (ii) здатністю пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3; (iii) здатністю знижувати рівні ErbB3 на поверхнях клітин (наприклад, викликаючи інтерналізацію ErbB3); (iv) пригнічення секреції VEGF клітин, що експресують ErbB3; (v) здатністю пригнічувати міграцію клітин, що експресують ErbB3; (vi) здатністю пригнічувати сфероїдальний ріст клітин, що експресують ErbB3; та/або (vii) здатністю зв'язуватись з епітопом, що розміщується на домені I (залишки 20-209) ErbB3, наприклад епітопом, який включає чи перекриває залишки 20-202 амінокислотної послідовності ErbB3.

Певні моноклональні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом демонструють  $K_D$  50 нМ чи менше при визначенні за допомогою проби з використанням поверхневого плазмонного резонансу чи проби на зв'язування клітин.

В інших варіантах здійснення конкретні моноклональні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % (наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % чи 99 %) тотожна амінокислотній послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, наведених в SEQ ID №:1, SEQ ID №:3, SEQ ID №:5, SEQ ID №:35 чи SEQ ID №: 37. Інші конкретні моноклональні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 80 % (наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % чи 99 %) тотожна амінокислотній послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, наведених в SEQ ID №:2,

SEQ ID №:4, SEQ ID №:6, SEQ ID №:36 чи SEQ ID №:38. Такі антитіла можуть включати також обидві вищезгадані варіабельні ділянки важкого ланцюга і легкого ланцюга.

Варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів таких антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, типово включають одну чи більше ділянку, що визначає комплементарність (CDR), яку ще називають гіперваріабельною ділянкою. Вони включають одну чи більше ділянку CDR1, CDR2 і CDR3. Відповідно, інші конкретні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають одну чи більше послідовність CDR, вибрану з варіабельної ділянки CDR1 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:7; варіабельної ділянки CDR2 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:8; варіабельної ділянки CDR3 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:9; варіабельної ділянки CDR1 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:10; варіабельної ділянки CDR2 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:11; варіабельної ділянки CDR3 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:12; та їх комбінації.

Ще інші конкретні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають одну чи більше послідовність CDR, вибрану з варіабельної ділянки CDR1 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:13; варіабельної ділянки CDR2 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:14; варіабельної ділянки CDR3 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:15; варіабельної ділянки CDR1 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:16; варіабельної ділянки CDR2 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:17; варіабельної ділянки CDR3 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:18; та їх комбінації.

Ще інші конкретні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають одну чи більше послідовність CDR, вибрану з варіабельної ділянки CDR1 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:19; варіабельної ділянки CDR2 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:20; варіабельної ділянки CDR3 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:21; варіабельної ділянки CDR1 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:22; варіабельної ділянки CDR2 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:23; варіабельної ділянки CDR3 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:24; та їх комбінації.

Ще інші конкретні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають одну чи більше послідовність CDR, вибрану з варіабельної ділянки CDR1 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:39; варіабельної ділянки CDR2 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:40; варіабельної ділянки CDR3 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:41; варіабельної ділянки CDR1 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:42; варіабельної ділянки CDR2 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:43; варіабельної ділянки CDR3 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:44; та їх комбінації.

Ще інші конкретні антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом включають одну чи більше послідовність CDR, вибрану з варіабельної ділянки CDR1 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:45; варіабельної ділянки CDR2 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:46; варіабельної ділянки CDR3 важкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:47; варіабельної ділянки CDR1 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:48; варіабельної ділянки CDR2 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:49; варіабельної ділянки CDR3 легкого ланцюга, що являє собою SEQ ID №:50; та їх комбінації.

Антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, можуть включати також одну чи більше ділянок CDR, які є щонайменше на 80 % (наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % чи 99 %) тотожними вищезгаданим CDR чи комбінаціям CDR.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіла і частини антитіл є повністю людськими (тобто, містять CDR і каркасні послідовності людини). Конкретні людські антитіла за цим винаходом включають ті, що мають варіабельну ділянку важкого ланцюга з гену зародкової лінії VH3 людини та/або варіабельну ділянку легкого ланцюга з гену зародкової лінії VH2 людини.

Даний винахід охоплює також моноклональні антитіла і їх частини, що зв'язуються з тими самими чи епітопами чи епітопами, що перекриваються, зв'язаними будь-якими іншими антитілами чи їх частинами, описаними тут (наприклад, епітопом, розміщеним на домені I ErbB3, таким як епітоп, що включає чи перекриває залишки 20-202 амінокислотної послідовності ErbB3). Антитіла, які мають таку саму активність, що й антитіла, описані тут, наприклад антитіла з такою самою послідовністю, що й Ab №6, також охоплюються даним винаходом.

Антитіла за даним винаходом включають всі відомі форми антитіл та інших білкових каркасів з властивостями, подібними до антитіл. Наприклад, таке антитіло може бути антитілом людини, гуманізованим антитілом, біспецифічним антитілом, химерним антитілом чи білковим каркасом з властивостями, подібними до антитіл, таким як фібронектин чи анкиринові повтори. Антитіло може бути також Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, афітілом, нанотілом чи домен-специфічним

антитілом. Антитіло може мати також будь-який з наступних ізотипів: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD і IgE.

В ще іншому варіанті здійснення даний винахід стосується також композицій, що містять комбінації антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, описаних тут, скомпоновані з прийнятним носієм та/або ад'ювантом. В одному конкретному варіанті здійснення така композиція містить два чи більше антитіл, які зв'язують різні епітопи на ErbB3, або антитіла, описані тут, комбінуються з протираковими антитілами, які не зв'язують ErbB3.

В ще іншому варіанті здійснення даний винахід стосується виділених нуклеїнових кислот, які кодують описані тут антитіла і їх частини, що зв'язують антиген. В конкретних варіантах здійснення така нуклеїнова кислота кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга, що являє собою нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 % (наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % чи 99 %) є тотожною з SEQ ID №:25, SEQ ID №:27, SEQ ID №:29, SEQ ID №:35 чи SEQ ID №:37 або яка гібридизується з ними за дуже строгих умов; або варіабельну ділянку легкого ланцюга, що являє собою нуклеотидну послідовність, яка щонайменше на 80 % (наприклад, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % чи 99 %) є тотожною з SEQ ID №:26, SEQ ID №:28, SEQ ID №:30, SEQ ID №:36 чи SEQ ID №:38 або яка гібридизується з ними за дуже строгих умов; або комбінації таких варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів.

Даний винахід стосується також трансгенних ссавців, що не є людиною, гібридом і трансгенних рослин, які експресують та/або продукують описані тут антитіла і їх частини, що зв'язують антиген.

Даний винахід стосується також набору, який включає одне чи більше виділене моноклональне антитіло чи його частини, що зв'язують антиген, описані тут, і, факультативно, інструкції щодо їх використання в лікуванні чи діагностуванні хвороби, пов'язаної із залежним від ErbB3 проведенням сигналів, такої як рак.

Антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом можуть знайти використання для широкого кола терапевтичних і діагностичних застосувань, зокрема в онкології. Відповідно, в своєму іншому аспекті, даний винахід стосується способу пригнічення опосередкованої EGF-подібним лігандом фосфорилляції ErbB3 у суб'єкта шляхом введення йому одного чи більше антитіла чи його частин, що зв'язують антиген, описаних тут, у кількості, достатній для пригнічення опосередкованої EGF-подібним лігандом фосфорилляції ErbB3. Даний винахід стосується також способів лікування різних видів раку у суб'єкта, включаючи, але не обмежуючись ними, меланому, рак молочної залози, рак яєчника, карциному нирок, рак шлунково-кишкового тракту чи ободової кишки, рак легень, світлоклітинну саркому і рак передміхурової залози, шляхом введення йому одного чи більше антитіла чи його частин, що зв'язують антиген, описаних тут, у кількості, достатній для лікування раку. Антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, можуть вводиться окремо або в комбінації з іншими терапевтичними препаратами, такими як протиракові препарати, наприклад з іншими антитілами, хіміотерапевтичними препаратами та/або опроміненням.

В ще інших варіантах здійснення даний винахід стосується способів для діагностування і прогнозування виходу хвороб (наприклад, раку), пов'язаних з ErbB3. В одному варіанті це досягається шляхом контактування антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, за цим винаходом (наприклад, *ex vivo* чи *in vivo*) з клітинами від суб'єкта і визначення рівня їх зв'язування з ErbB3 на цих клітинах. Аномально високий рівень зв'язування з ErbB3 буде свідчити про те, що у даного суб'єкта є рак, асоційований з ErbB3.

Інші характерні особливості і переваги даного винаходу стануть очевидними з наступного докладного опису, а також з формули винаходу.

Короткий опис пояснювальних малюнків

На Фіг. 1A і 1B представлені діаграми в вигляді стовпчиків, які показують зв'язування різних кандидатів на анти-ErbB3 антитіло (Fabs, які тут позначені як Ab) з ErbB3, експресованим на клітинах меланоми MALME-3M, з використанням вторинного антитіла козла проти людини Alexa 647.

На Фіг. 2A-2D представлені графіки, які показують величини  $K_D$  різних кандидатів на анти-ErbB3 антитіло. На Фіг. 2A-2B представлені графіки, які показують величини  $K_D$  антитіла №6 (тут позначається як Ab №6) і антитіла №3 (тут позначається як Ab №3), відповідно, визначені за допомогою методики поверхневого плазмонного резонансу. На Фіг. 2A-2D представлені графіки, які показують величини  $K_D$  Ab №6 і Ab №3, відповідно, визначені за допомогою проби на зв'язування з використанням клітин меланоми MALME-3M.

На Фіг. 3 представлено графік специфічності зв'язування анти-ErbB3 антитіла (Ab №6), яка оцінювалась за допомогою ELISA (імуноферментного твердофазного аналізу). EGFR, BSA і TGF- $\alpha$  слугували у якості контролю.

На Фіг. 4 графічно представлено здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) знижувати загальний рівень ErbB3 в клітинах меланоми MALME-3M *in vitro*, яка оцінювалась за допомогою ELISA (імуноферментного твердофазного аналізу).

5 На Фіг. 5A і 5B графічно представлено здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) регулювати на пониження рецептори ErbB3 на клітинах MALME-3M, яка оцінювалась за допомогою FACS-аналізу (аналізу збудженої флуоресценції сортованих клітин). Фіг. 5A показує результати, отримані при використанні IgG1 ізо типу цього антитіла. Фіг. 5B показує результати, отримані при використанні IgG2 ізо типу цього антитіла.

10 На Фіг. 6A-6D представлені графіки, які показують залежність від часу опосередкованої антитілом регуляції ErbB3 на пониження (Ab №6), яка оцінювалась за допомогою FACS-аналізу (аналізу збудженої флуоресценції сортованих клітин).

На Фіг. 7 представлена діаграма у вигляді стовпчиків, яка показує здатність різних анти-ErbB3 антитіл регулювати ErbB3 на пониження в клітинах меланоми *in vivo*.

15 На Фіг. 8 представлена діаграма у вигляді стовпчиків, яка показує здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) регулювати ErbB3 на пониження в ксенотрансплантатах ADRr *in vivo*.

На Фіг. 9 графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати проліферацію клітин MALME-3M в пробі на титроване світіння клітин.

На Фіг. 10 графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати проліферацію клітин в клітинній лінії яєчника, ADRr.

20 На Фіг. 11 графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати проліферацію клітин ACHN.

На Фіг. 12 представлена діаграма у вигляді стовпчиків, яка показує здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати фосфориляцію ErbB3 в ксенотрансплантатах ADRr *in vivo*.

25 На Фіг. 13A-13C графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати опосередковану бетацелуліном і херегуліном фосфориляцію ErbB3 в клітинах ADRr.

На Фіг. 14A-14B графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (IgG2 ізо тип Ab №6) пригнічувати фосфориляцію ErbB3 в клітинних лініях пухлини яєчника OVCAR 5 і OVCAR 8.

30 На Фіг. 15A-15C графічно представлена здатність бетацелуліну (BTC) зв'язувати ErbB1, продемонстровану відсутність зв'язування з негативними щодо ErbB1 клітинами MALME-3M (Фіг. 17A); зв'язуванням з позитивними щодо ErbB1 клітинами ADRr при концентраціях 10 нМ (Фіг. 17B) і 200 нМ (Фіг. 17B), відповідно, і пригніченням такого зв'язування препаратом Erbitux.

35 На Фіг. 16A-16B графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (IgG2 ізо тип Ab №6) пригнічувати опосередковане херегуліном проведення сигналів у клітинах MALME-3M. Фіг. 16A показує здатність Ab №6 пригнічувати опосередковану херегуліном фосфориляцію ErbB3 в клітинах MALME-3M, а Фіг. 16B – здатність Ab №6 пригнічувати фосфориляцію АКТ в клітинах MALME-3M.

40 На Фіг. 17A-17D графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати ріст пухлин (A) яєчника (клітини ADRr), (B) передміхурової залози (клітини Du145), (C) яєчника (клітини OVCAR8) і (D) підшлункової залози (клітини Colo357), яка оцінювалась за допомогою дослідження ксенотрансплантатів.

На Фіг. 18A і 18B графічно представлена здатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) (Фіг. 18A) і Fab як Ab №3 (Фіг. 18B) пригнічувати зв'язування херегуліну з ErbB3 на клітинах MALME-3M, яка оцінювалась за допомогою FACS-аналізу (аналізу збудженої флуоресценції сортованих клітин).

45 На Фіг. 19A і 19B графічно представлена здатність Ab №6 пригнічувати зв'язування епірегуліну з ErbB3 на клітинах ADRr. Фіг. 19A показує зв'язування епірегуліну з клітинами ADRr, а Фіг. 19B – здатність Erbitux і Ab №6 пригнічувати зв'язування епірегуліну з клітинами ADRr.

На Фіг. 20A і 20B графічно представлена здатність епідермального фактору росту, що зв'язує гепарин (HB-EGF), зв'язувати ErbB на клітинах ADRr (Фіг. 20A) і нездатність анти-ErbB3 антитіла (Ab №6) пригнічувати таке зв'язування (Фіг. 20B).

50 Фіг. 21A-21C показують амінокислотні послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів антитіл: Ab №6, Ab №3, Ab №14, Ab №17 і Ab №19.

Фіг. 22A-22B показують нуклеотидні послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів антитіл: Ab №6, Ab №3 і Ab №14.

55 Фіг. 23 показує амінокислотні послідовності варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів антитіл: Ab №6, Ab №17 і Ab №19, які було повернуто до відповідної зародкової амінокислотної послідовності. Зміни амінокислотних залишків підкреслені.

На Фіг. 24A і 24C графічно представлена здатність Ab №6 пригнічувати секрецію VEGF клітин пухлини.

На Фіг. 25 графічно показано вплив Ab №6 на міграцію клітин.

На Фіг. 26A-26C графічно показано (A) пригнічення сфероїдального росту в клітинах AdrR, (B) пригнічення індукованого HRG сфероїдального росту в клітинах AdrR і (C) пригнічення індукованого HRG сфероїдального росту в клітинах Du145.

На Фіг. 27A і 27B графічно показано вплив Ab №6 на зв'язування (A) HRG і (B) BTC з клітинами AdrR.

На Фіг. 28 графічно показано вплив Ab №6 на індуковану HGF фосфориліацію ErbB3.

На Фіг. 29A і 29B показано вплив Ab №6 на фосфориліацію (A) pErbB1 і pErbB3 і (B) індуковане HRG утворення комплексу ErbB2/3.

На Фіг. 30 графічно показано, що Ab №6 зв'язує амінокислотні залишки 20-202 ErbB3.

Докладний опис винаходу

Для того, щоб полегшити сприйняття даного винаходу, спочатку будуть визначені основні терміни.

I. Дефініції

Терміни "ErbB3", "HER3", "рецептор ErbB3" і "рецептор HER3", які використовуються тут взаємозамінно, стосуються білку ErbB3 людини, як його описано в патенті США №5,480,968 і в статті Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4905-4909 (1990); дивись також Kani et al., Biochemistry 44:15842-857 (2005), Cho & Leahy, Science 297:1330-1333 (2002)).

Термін "EGF-подібний ліганд", як він тут використовується, стосується лігандів рецептору епідермального фактору росту (EGFR), включаючи епідермальний фактор росту (EGF) і близько споріднені з ним білки, такі як трансформуючий фактор росту- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), бетацелулін (BTC), епідермальний фактор росту, що зв'язує гепарин (HB-EGF), бірегулін (BIR) і амфірегулін (AR), які зв'язуються з EGFR на поверхні клітин і стимулюють активність власної протеїнтирозинкінази цього рецептору. Більш конкретно, EGF-подібні ліганди індукують утворення EGFR (який позначають також як ErbB1) і комплексу білків ErbB3 (дивись також Kim et al., (1998) Biochem J., 334:189-195), що має своїм результатом фосфориліацію тирозинових залишків в цьому комплексі.

Антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом пригнічують опосередковану EGF-подібним лігандом фосфориліацію ErbB3 і, в певних варіантах здійснення, демонструють одну чи більше з наступних додаткових властивостей: (i) здатність пригнічувати опосередковане одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену і бірегуліну (BIR) проведення сигналів через ErbB3; (ii) здатність пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3; (iii) здатність знижувати рівень ErbB3 на поверхні клітин; (iv) здатність пригнічувати секрецію VEGF клітин, що експресують ErbB3; (v) здатність пригнічувати міграцію клітин, що експресують ErbB3; та/або (vii) здатність зв'язуватись з епітопом, який міститься на домені I ErbB3, наприклад з епітопом, що включає чи перекриває залишки 20-202 амінокислотної послідовності ErbB3.

Термін "пригнічення", як він тут використовується, стосується будь-якого статистично достовірного зниження біологічної активності, включаючи повне блокування такої активності. Наприклад, "пригнічення" може стосуватись зниження біологічної активності приблизно на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % чи 100 %.

Відповідно, фраза "пригнічення опосередкованої EGF-подібним лігандом фосфориліації ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати фосфориліацію ErbB3, індуковану EGF-подібним лігандом, по відношенню до фосфориліації в необробленій (контрольній) клітині. Клітиною, яка експресує ErbB3, може бути клітина чи клітинна лінія, що зустрічається природно, або вона може бути рекомбінантно створеною шляхом введення нуклеїнової кислоти, кодуєної ErbB3, в клітину-хазяїна. В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіло чи його частини, що зв'язує антиген, пригнічує опосередковану EGF-подібним лігандом фосфориліацію ErbB3 щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 %, що визначається, наприклад, за допомогою вестерн блотингу з наступним використанням антифосфотирозинового антитіла, як описано в публікації Kim et al., (1998) Biochem J., 334:189-195 і в подальших Прикладах.

Фраза "пригнічення опосередкованого херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном проведення сигналів через ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати проведення сигналів, опосередковане лігандом ErbB3 (наприклад, херегуліном, епірегуліном, епігеном і бірегуліном), через ErbB3 по відношенню до проведення сигналів за відсутності такого антитіла (контроль). ErbB3-ліганди тут також позначаються як "херегулін-подібні ліганди". Це означає, що в присутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом сигнал,

опосередкований в клітині, що експресує ErbB3, одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену і бірегуліну, є статистично достовірно зниженим по відношенню до контролю (за відсутності антитіла). Опосередкований ErbB3-лігандом сигнал може бути оцінений шляхом визначення рівня активності субстрату ErbB3 та/або білку, який присутній в клітинному каскаді за участі ErbB3. В одному варіанті здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, знижує рівень активності субстрату ErbB3 та/або активність білку, який присутній в клітинному каскаді за участі ErbB3, щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 % по відношенню до рівня активності за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Таке опосередковане ErbB3-лігандом проведення сигналів може оцінюватись за допомогою методів, відомих в цій галузі, які визначають рівень активності субстрату ErbB3 (наприклад, SHC чи PI3K) або білку, який присутній в клітинному каскаді за участі ErbB3 (наприклад, AKT), використовуючи аналіз кіназної активності щодо таких білків (дивись, наприклад, Horst et al. supra, Sudo et al. (2000) *Methods Enzymol.* 322:388-92; а також Morgan et al. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191:761-767).

В одному конкретному варіанті здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, пригнічує опосередковане ErbB3-лігандом (наприклад, херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном) проведення сигналів через ErbB3 шляхом пригнічення зв'язування ErbB3-ліганду (наприклад, одного чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) з ErbB3. Деякі ліганди (наприклад, бірегулін чи BIR) функціонують і як EGF-подібні ліганди (тобто зв'язуються з EGFR/ErbB1), і як ErbB3-подібні ліганди (тобто зв'язуються з ErbB3).

Фраза "пригнічення зв'язування херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну з ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язують антиген, статистично достовірно зменшувати зв'язування ліганду ErbB3 (наприклад, одного чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) з ErbB3 по відношенню до зв'язування за відсутності такого антитіла (контроль). Це означає, що в присутності антитіла чи його частини, що зв'язують антиген, кількість ErbB3-ліганду (наприклад, херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну), яка зв'язується з ErbB3, є статистично достовірно зменшеною по відношенню до контролю (за відсутності антитіла). Кількість ліганду ErbB3, яка зв'язує ErbB3, може бути зменшеною в присутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 % по відношенню до такої кількості за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Зменшення зв'язування ErbB3-ліганду може оцінюватись за допомогою відомих в цій галузі методів, які визначають рівень зв'язування міченого ErbB3-ліганду (наприклад, радіоактивно міченого херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) до клітин, що експресують ErbB3, в присутності чи за відсутності (контроль) антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом.

Фраза "пригнічення проліферації клітин, що експресують ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати проліферацію клітини, що експресує ErbB3, по відношенню до проліферації за відсутності такого антитіла. В одному варіанті здійснення проліферація клітини, що експресує ErbB3 (наприклад, ракової клітини), може бути зменшеною щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 %, коли клітини контактують з антитілом чи його частиною, що зв'язує антиген, за цим винаходом по відношенню до проліферації за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Проліферація клітин може оцінюватись методами, відовими в цій галузі, які визначають швидкість поділу клітин, фракцію клітин в даній популяції, яка піддається поділу, та/або швидкість втрати клітин з даної їх популяції через термінальну диференціацію чи загибель клітин (наприклад, за допомогою аналізу титрованого світіння сортованих клітин чи включення тимидину).

Фраза "здатність знижувати рівень ErbB3 на поверхні клітин", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати кількість ErbB3 на поверхні клітини, яку було піддано дії антитіла, по відношенню до необробленої (контрольної) клітини. Наприклад, зниження рівня ErbB3 на поверхні клітин може бути наслідком збільшеної інтерналізації ErbB3 (чи збільшеного ендоцитозу ErbB3). В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, зменшує експресію ErbB3 на поверхні клітин щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 % по відношенню до рівня експресії ErbB3 на поверхні клітин за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль).



або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 % та/або збільшує інтерналізацію рецептору ErbB3 щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 % по відношенню до експресії на поверхні клітин чи інтерналізації за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Рівні ErbB3 на поверхнях клітин та/або інтерналізація рецептору ErbB3 в присутності і за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, можуть легко оцінюватись за допомогою методів, відомих в цій галузі, таких як описані в публікації Horst et al., supra та в подальших прикладах.

Фраза "пригнічення секреції VEGF клітин, що експресують ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати секрецію VEGF клітин, що експресують ErbB3, по відношенню до секреції VEGF за відсутності такого антитіла. В одному варіанті здійснення даного винаходу секреція VEGF клітини, що експресує ErbB3 (наприклад, ракової клітини), може бути зменшеною щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 %, коли клітини контактують з антитілом чи його частиною, що зв'язує антиген, за цим винаходом по відношенню до секреції VEGF за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Секрецію VEGF можна оцінити методами, відовими в цій галузі, такими як описані тут.

Фраза "пригнічення міграції клітин, що експресують ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати міграцію клітин, що експресують ErbB3, по відношенню до міграції за відсутності такого антитіла. В одному варіанті здійснення даного винаходу міграція клітини, що експресує ErbB3 (наприклад, ракової клітини), може бути зменшеною щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 %, коли клітини контактують з антитілом чи його частиною, що зв'язує антиген, за цим винаходом по відношенню до міграції за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Секрецію VEGF можна оцінити методами, відовими в цій галузі, такими як описані тут.

Фраза "пригнічення сфероїдального росту клітин, що експресують ErbB3", як вона тут використовується, стосується здатності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, статистично достовірно зменшувати міграцію клітини, що експресує ErbB3, по відношенню до міграції за відсутності такого антитіла. В одному варіанті здійснення даного винаходу міграція клітини, що експресує ErbB3 (наприклад, ракової клітини), може бути зменшеною щонайменше на 10 %, або щонайменше на 20 %, або щонайменше на 30 %, або щонайменше на 40 %, або щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 %, або щонайменше на 70 %, або щонайменше на 80 %, або щонайменше на 90 %, або 100 %, коли клітини контактують з антитілом чи його частиною, що зв'язує антиген, за цим винаходом по відношенню до міграції за відсутності такого антитіла чи його частини, що зв'язує антиген (контроль). Секрецію VEGF можна оцінити методами, відовими в цій галузі, такими як описані тут. Терміни "антитіло" чи "імуноглобулін", які тут використовуються взаємозамінно, включають цілі антитіла і будь-який їх фрагмент (тобто, "частину, що зв'язує антиген") чи одиночні ланцюги, що зв'язують антиген. "Антитіло" включає щонайменше два важких (H) ланцюги і два легких (L) ланцюги, що з'єднані між собою дисульфідними зв'язками. Кожний важкий ланцюг має варіабельну ділянку важкого ланцюга (яка тут скорочено позначається як  $V_H$ ) і постійну ділянку важкого ланцюга. Постійна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг має варіабельну ділянку легкого ланцюга (яка тут скорочено позначається як  $V_L$ ) і постійну ділянку легкого ланцюга. Постійна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену, CL. На ділянках  $V_H$  і  $V_L$  можуть бути далі виділені ділянки гіперваріабельності, які називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR). Ділянки CDR вставлені в проміжки між ділянками, що є більш законсервованими, які називають каркасними ділянками (FR). Кожна ділянка  $V_H$  і  $V_L$  складається з трьох ділянок CDR і чотирьох ділянок FR, які розміщуються від N-кінця білкового ланцюга до його карбоксильного кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Постійні ділянки антитілу можуть опосередковувати

зв'язування імуноглобуліну з тканинами чи факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу. Показові антитіла за цим винаходом включають антитіла №1, №3 і №14 та їх частини, що зв'язують антиген.

5 Термін "частина антитіла, що зв'язує антиген" або просто "частина антитіла", як він тут використовується, стосується одного чи більше фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватись з антигеном (наприклад, ErbB3). Було показано, що функція зв'язування антигену може виконуватись фрагментами антитіла повної довжини. Приклади зв'язувальних фрагментів, які охоплюються терміном "частина антитіла, що зв'язує антиген",  
10 включають (i) фрагмент Fab, моновалентний фрагмент, що складається з доменів  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $CL$  і  $CH1$ ; (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , двохвалентний фрагмент, що містить два фрагменти Fab, зв'язані дисульфідним містком на шарнірній ділянці; (iii) фрагмент  $F_d$ , що складається з доменів  $V_H$  і  $CH1$ ; (iv) фрагмент  $F_v$ , що складається з доменів  $V_L$  і  $V_H$  одного плеча антитіла; (v)  $dAb$ , що включає домени  $V_H$  і  $V_L$ ; (vi) фрагмент  $dAb$  (Ward et al. (1989) Nature 341, 544-546), який містить  
15 домен  $V_H$ ; (vii)  $dAb$ , який містить домен  $V_H$  чи  $V_L$ ; і (viii) виділену ділянку, що визначає комплементарність (CDR) чи (ix) комбінацію двох чи більше виділених CDR, які факультативно можуть бути з'єднаними синтетичним лінкером. Більш того, хоча два домени фрагменту  $F_v$ ,  $V_L$  і  $V_H$ , кодуються окремими генами, їх можна об'єднати за допомогою рекомбінантних методів синтетичним лінкером з утворенням єдиного білкового ланцюга, в якому ділянки  $V_L$  і  $V_H$   
20 паруються в моновалентні молекули, відомі як  $F_v$  з єдиним ланцюгом (scFv); дивись, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242, 423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883). Мається на увазі, що такі антитіла з єдиним ланцюгом охоплюються терміном "частина антитіла, що зв'язує антиген". Ці фрагменти антитіл отримують за допомогою звичайних методів, відомих спеціалістам в цій галузі, і їх відбирають для використання так само, як інтактні антитіла. Частини антитіл, що зв'язують антиген, можуть бути отримані за методиками, які використовують рекомбінантну ДНК, або ферментативним чи хімічним розщепленням інтактних імуноглобулінів.

Термін "моноклональне антитіло", як він тут використовується, стосується антитіла, отриманого з популяції суттєво гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що складають цю  
30 популяцію, є ідентичними, за виключенням можливих мутацій, які трапляються природно і які можуть бути присутніми в незначній кількості. Моноклональні антитіла є високо специфічними, будучи спрямованими проти єдиної ділянки детермінанти. Більш того, на відміну від препаратів, що містять звичайні (поліклональні) антитіла і типово включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло є спрямованим проти єдиної  
35 детермінанти на антигені. Моноклональні антитіла можуть бути отримані за допомогою методів, відомих в цій галузі і описаних тут, таких як, наприклад, метод гібридоми, як описано Kohler et al. (1975) Nature, 256:495, метод використання трансгенної тварини, як описано, наприклад в публікації Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859), методів рекомбінантної ДНК (дивись, наприклад, патент США № 4,816,567), або за допомогою бібліотек фагових антитіл з  
40 використанням методик, описаних, наприклад, в публікаціях Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) та Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991). Моноклональні антитіла включають химерні антитіла, антитіла людини і гуманізовані антитіла і можуть зустрічатись природно або бути отриманими рекомбінантно.

Термін "рекомбінантне антитіло" стосується антитіл, які отримуються, експресуються, створюються чи виділяються рекомбінантними засобами, таких як (а) антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), що є трансгенною чи трансхромосомною щодо імуноглобулінових генів (наприклад, імуноглобулінових генів людини), чи гібридами, отриманої з них; (б) антитіла, виділені з клітини-хазяїна, трансформованої таким чином, щоб експресувати це антитіло, наприклад з трансфектоми; (в) антитіла, виділені з бібліотеки рекомбінантних комбінаторних  
50 антитіл (наприклад такої, що містить послідовності антитіл людини) за допомогою фагового дисплею; і (г) антитіла, які отримуються, експресуються, створюються чи виділяються будь-якими іншими засобами, які включають сплайсинг послідовностей імуноглобулінових генів (наприклад, імуноглобулінових генів людини) до інших послідовностей ДНК. Такі рекомбінантні антитіла можуть мати варіабельні і постійні ділянки, що походять від зародкових імуноглобулінових послідовностей людини. Однак, в певних варіантах здійснення даного винаходу такі рекомбінантні антитіла людини можуть бути піддані мутагенезу *in vitro* і, відповідно, амінокислотні послідовності ділянок  $V_H$  і  $V_L$  таких рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, хоча походять від зародкових послідовностей  $V_H$  і  $V_L$  людини і споріднені з ними, можуть не існувати природно в зародковому репертуарі антитіл людини *in vivo*.

Термін "химерний імуноглобулін" чи антитіло стосується імуноглобуліну чи антитіла, варіабельні ділянки яких походять від першого виду, а постійні ділянки – від другого виду. Химерні імуноглобуліни чи антитіла можуть бути створені, наприклад, методами генної інженерії з сегментів генів імуноглобуліну, що належать різним видам.

Термін "антитіло людини", як він тут використовується, включає антитіла з варіабельними ділянками, в яких каркасні і CDR ділянки походять від зародкових імуноглобулінових послідовностей людини, як описали, наприклад, Kabat et al. (Дивись Kabat, et al. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Більш того, якщо таке антитіло містить постійну ділянку, ця постійна ділянка також походить від зародкових імуноглобулінових послідовностей людини. Антитіла людини можуть включати амінокислотні залишки, які не кодовані зародковими імуноглобуліновими послідовностями людини (наприклад, мутації, введені випадковим чи сайт-специфічним мутагенезом *in vitro* чи соматичною мутацією *in vivo*). Однак термін "антитіло людини", як він тут використовується, не включає антитіл, в яких послідовності CDR, що походять від ембріональної лінії інших видів ссавців, таких як миша, було трансплантовано на каркасні послідовності людини.

Антитіло людини може мати щонайменше одну чи більше амінокислот, заміщених амінокислотним залишком, наприклад посилюючим активність амінокислотним залишком, що не є кодованим зародковою імуноглобуліновою послідовністю людини. Типово, антитіло людини може мати до двадцяти позицій, заміщених амінокислотними залишками, які не є частиною зародкової імуноглобулінової послідовності людини. В одному конкретному варіанті здійснення ці заміщення припадають на ділянки CDR, як докладно буде описано далі.

Термін "гуманізований імуноглобулін" чи "гуманізоване антитіло" стосується імуноглобуліну чи антитіла, які включають щонайменше один ланцюг гуманізованого імуноглобуліну чи антитіла (тобто, щонайменше один гуманізований важкий чи легкий ланцюг).

Термін "ланцюг гуманізованого імуноглобуліну" чи "ланцюг гуманізованого антитіла" (тобто, "легкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну" чи "важкий ланцюг гуманізованого імуноглобуліну") стосується ланцюга імуноглобуліну чи антитіла (тобто, легкого чи важкого ланцюга, відповідно), варіабельна ділянка якого включає варіабельну каркасну ділянку від імуноглобуліну чи антитіла людини і ділянки, що визначають комплементарність (CDR), (наприклад, щонайменше CDR, краще два CDR, а ще краще три CDR) суттєво від імуноглобуліну чи антитіла не людини, і додатково включає постійні ділянки (наприклад, щонайменше одну постійну ділянку чи її частину у випадку легкого ланцюга і переважно три постійні ділянки у випадку важкого ланцюга). Термін "гуманізована варіабельна ділянка" (наприклад, "гуманізована варіабельна ділянка легкого ланцюга" чи "гуманізована варіабельна ділянка важкого ланцюга") стосується варіабельної ділянки, яка включає варіабельну каркасну ділянку суттєво від імуноглобуліну чи антитіла людини і ділянки, що визначають комплементарність (CDR) суттєво від імуноглобуліну чи антитіла не людини.

"Біспецифічне" чи "біфункціональне антитіло" – це штучне гібридне антитіло, що має дві різні пари важкого/легкого ланцюгів і два різних сайти зв'язування. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані різними методами, включаючи зрощування гібридом чи зв'язування фрагментів Fab'. Дивись, наприклад, Songsivilai & Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79, 315-321; Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148, 1547-1553. В одному конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло за даним винаходом включає сайти зв'язування і для ErbB3, і для IGF1-R (тобто, для рецептору інсулін-подібного фактору росту 1). В іншому варіанті здійснення біспецифічне антитіло за цим винаходом включає сайти зв'язування для ErbB3 і C-MET. В інших варіантах здійснення біспецифічне антитіло включає сайт зв'язування для ErbB3 і сайт зв'язування для ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFR, Lewis Y, EpCAM, CA125, специфічного до передміхурової залози мембранного антигену, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , C-KIT чи будь-якого з рецепторів FGF.

Термін "гетерологічне антитіло", як він тут використовується, визначається по відношенню до трансгенного організму, що не є людиною, чи рослини, які продукують таке антитіло.

Термін "виділене антитіло", як він тут використовується, стосується антитіла, що є суттєво вільним від інших антитіл, які мають різні антигенні специфічності (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з ErbB3, є суттєво вільним від антитіл, що специфічно зв'язують інші ніж ErbB3 антигени). До того ж, виділене антитіло типово є суттєво вільним від іншого клітинного матеріалу та/або хімічних сполук. В одному варіанті здійснення даного винаходу комбінація "виділених" моноклональних антитіл з різною специфічністю щодо зв'язування ErbB3 утворює добре визначену композицію.

Термін "ізотип", як він тут використовується, стосується класу антитіла (наприклад, IgM чи IgG1), який кодується генами постійної ділянки важкого ланцюга. В одному варіанті здійснення

антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, є ізотипом, вибраним з наступних ізотипів антитіла: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD чи IgE. В певних варіантах здійснення моноклональне антитіло за цим винаходом належить до ізотипу IgG2.

5 Термін "переключення ізотипу", як він тут використовується, стосується того явища, коли клас чи ізотип антитіла змінюється з Ig одного класу на Ig інших класів.

Термін "не переключений ізотип", як він тут використовується, стосується ізотипного класу важкого ланцюга, який отримується тоді, коли ніякого переключення ізотипу не відбувається; ген СН, який кодує такий не переключений ізотип, типово є першим геном СН, що розміщується безпосередньо перед функціонально реаранжованим геном VDJ. Переключення ізотипу було  
10 класифіковано як класичне чи некласичне переключення ізотипу. Класичне переключення ізотипу відбувається при явищах рекомбінації, які передбачають щонайменше одну ділянку з послідовністю переключення в гені, що кодує антитіло. Некласичне переключення ізотипу може відбуватись, наприклад, при гомологічній рекомбінації між  $\sigma_{\mu}$  людини і  $\Sigma_{\mu}$  людини (δ-асоційована делеція). Альтернативні механізми некласичного переключення, такі як  
15 інтертранскрипційна та/або міжхромосомна рекомбінація, серед інших, можуть траплятись і здійснювати переключення ізотипу.

Термін "послідовність переключення", як він тут використовується, стосується тих послідовностей ДНК, які відповідають за рекомбінацію на етапі переключення. Послідовність "донора переключення", типово ділянка  $\mu$  переключення, буде 5' (тобто, вище) конструктивної  
20 ділянки і буде стерта під час рекомбінації на етапі переключення. Ділянка "акцептора переключення" буде знаходитись між конструктивною ділянкою, яку буде стерто, і постійною ділянкою заміщення (наприклад,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  і т.д.). Оскільки не існує якогось специфічного місця, де завжди відбувається рекомбінація, кінцеву послідовність гену типово не можна передбачити за конструктивною ділянкою.

25 "Антиген" є сутністю (наприклад, білковоподібною сутністю чи пептидом), з якою зв'язується антитіло чи його частина, що зв'язує антиген. В різних варіантах здійснення даного винаходу антигеном є ErbB3 чи ErbB3-подібна молекула. В одному конкретному варіанті здійснення даного винаходу антигеном є ErbB3 людини.

Термін "епітоп" чи "антигенна детермінанта" стосується місця (сайту) на антигені, з яким  
30 специфічно зв'язується імуноглобулін чи антитіло. Епітопи можуть бути утвореними із замісних амінокислот чи незамінних амінокислот, які суміщуються з третинним фолдингом (укладкою, білку. Епітопи, утворені із замісних амінокислот, типово витримують дію денатуруючих розчинників, тоді як епітопи, утворені третинною укладкою, типово втрачаються після обробки денатуруючими розчинниками. Епітоп типово включає щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,  
35 13, 14 чи 15 амінокислот в унікальній просторовій конформації. Методи визначення просторової конформації епітопів включають методи, відомі в цій галузі, і ті, що описані тут, наприклад рентгенівська кристалографія і двомірний ядерний магнітний резонанс. Дивись, наприклад, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Даний винахід охоплює також антитіла, які зв'язують той самий чи частково покриваючий  
40 епітоп, що й антитіла за цим винаходом, тобто антитіла, які конкурують за зв'язування з ErbB3, або зв'язують епітопи, які перекриваються з епітопами, зв'язаними описаними тут антитілами, тобто епітоп, розміщений на домені I ErbB3. Антитіла, які впізнають той самий епітоп, можуть бути ідентифіковані за допомогою рутинних методів, таких як імунологічний аналіз, наприклад з визначенням здатності одного антитіла блокувати зв'язування іншого антитіла з антигеном-мішенню, тобто методом конкурентного зв'язування. Конкурентне зв'язування оцінюється за  
45 методикою, в якій імуноглобулін, що тестується, пригнічує специфічне зв'язування контрольного антитіла з поширеним антигеном, таким як ErbB3. Відомі численні різновиди методу конкурентного зв'язування, наприклад: твердофазний прямий чи непрямий радіоімунний аналіз (RIA), твердофазний прямий чи непрямий ферментативний імунологічний аналіз (EIA), метод сандвіч-конкуренції (дивись Stahli et al., (1983) Methods in Enzymology 9:242); твердофазний прямий біотин-авідиновий ферментативний імунологічний аналіз (EIA) (дивись Kirkland et al., (1986) J. Immunol. 137:3614); твердофазний прямий радіоізотопний аналіз, твердофазний прямий радіоізотопний сандвіч-аналіз (дивись Harlow & Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазний прямий радіоізотопний RIA з використанням  
50 мітки  $I^{125}$  (дивись Morel et al., (1988) Mol. Immunol. 25(1):7); твердофазний прямий біотин-авідиновий EIA (Cheung et al., (1990) Virology 176:546); і прямий радіоізотопний RIA (Moldenhauer et al., (1990) Scand. J. Immunol. 32:77). Типово, такий аналіз передбачає використання очищеного антигену (наприклад, ErbB3), зв'язаного з твердою поверхнею, чи клітин, що несуть те і інше, неміченого імуноглобуліну, що тестується, і міченого контрольного  
60 імуноглобуліну. Конкурентне пригнічення оцінюється шляхом визначення кількості мітки,

зв'язаної з твердою поверхнею чи клітинами в присутності імуноглобуліну, що тестується. Звичайно, імуноглобулін, що тестується, має бути присутнім в надлишку. Звичайно, коли конкуруюче антитіло присутнє в надлишку, воно буде пригнічувати специфічне зв'язування контрольного антитіла з загальним антигеном щонайменше на 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % чи більше.

Терміни "специфічне зв'язування", "специфічно зв'язує", "селективне зв'язування" і "селективно зв'язує", як вони тут використовуються, означають, що антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, демонструє помітну афінність до якогось конкретного антигену чи епітопу і, загалом, не демонструє суттєвої перехресної реактивності з іншими антигенами чи епітопами. "Помітне" чи переважне зв'язування включає зв'язування з афінністю щонайменше  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$   $M^{-1}$  чи  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Краще, щоб афінність перевищувала  $10^7$   $M^{-1}$ , а ще краще, щоб вона перевищувала  $10^8$   $M^{-1}$ . Величини, проміжні до тих, що наведені тут, також входять в об'єм даного винаходу, і краща афінність до зв'язування може вказуватись як діапазон значень, наприклад від  $10^6$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ , краще від  $10^7$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ , ще краще від  $10^8$  до  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Антитіло, "яке не демонструє суттєвої перехресної реактивності", це таке антитіло, яке не буде помітно зв'язуватись з небажаною сутністю (наприклад, небажаною білкоподібною сутністю). Наприклад, в одному варіанті здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, які специфічно зв'язуються з ErbB3, будуть помітно зв'язувати цю молекулу ErbB3, але не будуть суттєво реагувати з іншими молекулами ErbB і не-ErbB білками чи пептидами. Специфічне чи селективне зв'язування може оцінюватись відомими в цій галузі засобами для визначення такого зв'язування, включаючи, наприклад, аналіз за Scatchard та/або аналізи на конкурентне зв'язування.

Термін " $K_D$ ", як він тут використовується, стосується константи рівноваги дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген чи афінності антитіла до антигену. В одному варіанті здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, за цим винаходом зв'язують антиген (наприклад, ErbB3) з афінністю ( $K_D$ ) 50 нМ чи більше (або менше) (наприклад, 40 нМ, чи 30 нМ, чи 20 нМ, чи 10 нМ, чи менше), що оцінюється за допомогою поверхневого плазмонного резонансного аналізу чи методом зв'язування клітин. В одному конкретному варіанті здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, за цим винаходом зв'язують ErbB3 з афінністю ( $K_D$ ) 8 нМ чи більше (наприклад, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ, 1,4 нМ, 1,3 нМ, 1 нМ чи менше) при визначенні за допомогою поверхневого плазмонного резонансного аналізу чи методом зв'язування клітин. В інших варіантах здійснення антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, зв'язують антиген (наприклад, ErbB3) з афінністю ( $K_D$ ), меншою ніж приблизно  $10^{-7}$  М, такою як  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М чи  $10^{-10}$  М або навіть меншою при визначенні за методикою поверхневого плазмонного резонансу (SPR) на приладі BIACORE 3000 з використанням рекомбінантного ErbB3 в якості того, що визначається при аналізі, і антитіла в якості ліганду. Зв'язування з цим попередньо визначеним антигеном відбувається з афінністю, яка щонайменше вдвічі перевищує афінність до зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїном), іншим ніж цей попередньо визначений антиген чи якийсь близько споріднений антиген.

Термін " $K_{off}$ ", як він тут використовується, стосується константи швидкості дисоціації для дисоціації антитіла з комплексу антитіло/антиген.

Термін "EC50", як він тут використовується, стосується концентрації антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, яка викликає реакцію при аналізі *in vitro* чи *in vivo*, що становить 50 % від максимальної реакції, тобто знаходиться посередині між максимальною реакцією і вихідним рівнем.

Термін "характер глікозилювання", як він тут використовується, визначається як структура вуглеводневих одиниць, ковалентно приєднаних до білку, а конкретніше до імуноглобулінового білку.

Термін "такий, що трапляється природно", як він тут використовується, у застосуванні до об'єкту стосується тієї обставини, що цей об'єкт може бути знайдений у природі. Наприклад, поліпептидна чи полінуклеотидна послідовність, що присутня в організмі (у вірусах включно), яку можна виділити з якогось джерела у природі і яку не було умисно модифіковано людиною в лабораторії, є такою, що трапляється природно.

Термін "реаранжована", як він тут використовується, стосується конфігурації локусу імуноглобуліну важкого ланцюга чи легкого ланцюга, в якому V сегмент розміщується безпосередньо суміжно з D-J чи J сегментом в конформації, що кодує суттєво весь домен  $V_H$  чи  $V_L$ , відповідно. Реаранжований локус гену імуноглобуліну може бути ідентифікований шляхом порівняння із зародковою ДНК; реаранжований локус буде мати щонайменше один рекомбінований гептамер/нонамерний гомологічний елемент.

Термін "нереаранжована" або "зародкова конфігурація", як він тут використовується по відношенню до V сегменту, стосується такої конфігурації, в якій V сегмент не є рекомбінованим таким чином, щоб бути безпосередньо суміжним з D чи J сегментом.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти", як він тут використовується, включає молекули ДНК і молекули РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою чи дволанцюговою, але переважно є дволанцюговою ДНК.

Термін "виділена молекула нуклеїнової кислоти", як він тут використовується по відношенню до нуклеїнових кислот, що кодують антитіла чи частини антитіл (наприклад,  $V_H$ ,  $V_L$ , CDR3), які зв'язуються з ErbB3, стосується молекули нуклеїнової кислоти, в якій нуклеотидні послідовності, що кодують антитіло чи частину антитіла, є вільними від інших нуклеотидних послідовностей, що кодують антитіла, які зв'язують антигени, інші ніж ErbB3, причому ці інші послідовності можуть природно бути розташованими з боків нуклеїнової кислоти в геномній ДНК людини.

Термін "модифікація", як він тут використовується, стосується зміни однієї чи більше амінокислот в антитілах чи їх частинах, що зв'язують антиген. Така зміна може здійснюватись шляхом додавання, заміщення чи видалення якоїсь амінокислоти в одній чи більше позиції. Для цього використовуються відомі в цій галузі методи, такі як ПЛР мутагенез. Наприклад, в певних варіантах здійснення даного винаходу антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, ідентифіковані за допомогою способів за цим винаходом, можуть бути модифіковані, щоб тим самим модифікувати афінність до зв'язування цього антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, з ErbB3.

Даний винахід охоплює також "консервативні амінокислотні заміщення" в послідовностях антитіл за цим винаходом, тобто такі модифікації нуклеотидних і амінокислотних послідовностей, які не скасовують зв'язування антитіла, кодованого цією нуклеотидною послідовністю, чи такого, що містить цю амінокислотну послідовність, з антигеном, тобто з ErbB3. Консервативні амінокислотні заміщення включають заміщення амінокислоти одного класу амінокислотою того самого класу, де клас визначається загальними фізико-хімічними властивостями бокового ланцюга амінокислоти. У природі з високою частотою зустрічаються заміщення в гомологічних білках, що визначається за допомогою, наприклад, стандартної матриці частоти обміну Дайхофа чи матриці BLOSUM. Виділяють шість загальних класів бокових ланцюгів амінокислот: Клас I (Cys); Клас II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Клас III (Asn, Asp, Gln, Glu); Клас IV (His, Arg, Lys); Клас V (Ile, Leu, Val, Met); та Клас VI (Phe, Tyr, Trp). Наприклад, заміщення Asp на інший залишок класу III, такий як Asn, Gln чи Glu, є консервативним заміщенням. Отже, прогнозований залишок замісної амінокислоти в анти-ErbB3 антитілі краще заміщувати залишком іншої амінокислоти з того самого класу. Методи ідентифікації нуклеотидних і амінокислотних консервативних заміщень, які не усувають зв'язування антигену, є добре відомими спеціалістам в цій галузі (дивись, наприклад, Brummell et al., *Biochem. J.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); а також Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Термін "неконсервативне амінокислотне заміщення" стосується заміщення амінокислоти одного класу амінокислотою з іншого класу; наприклад, заміщення Ala, залишку класу II, залишком з класу III, таким як Asp, Asn, Glu чи Gln.

Альтернативно, в іншому варіанті здійснення, мутації (консервативні чи неконсервативні) можуть вводиться по всій кодуючій послідовності чи по частині кодуючої послідовності анти-ErbB3 антитіла, як при мутагенезі з насиченням, і отримані модифіковані анти-ErbB3 антитіла можуть бути відібрані за активністю зв'язування.

"Консенсусна послідовність" – це послідовність, утворена з найпоширеніших амінокислот (чи нуклеотидів) в родині споріднених послідовностей (дивись, наприклад, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)). В родині білків кожену позицію в консенсусній послідовності займає амінокислота, яка найчастіше зустрічається в цій позиції в цій родині. Якщо дві амінокислоти зустрічаються з однаковою частотою, кожна з них може включатись в консенсусну послідовність. "Консенсусний каркас" імуноглобуліну стосується каркасної ділянки в консенсусній імуноглобуліновій послідовності.

Так само, консенсусна послідовність для ділянок CDR може бути отримана шляхом оптимального суміщення амінокислотних послідовностей CDR антитіл ErbB3 за цим винаходом.

Для нуклеїнових кислот термін "суттєва гомологія" вказує на те, що дві нуклеїнові кислоти чи їх визначені послідовності при оптимальному суміщенні і порівнянні є ідентичними, з відповідними вставками чи делеціями, по щонайменше 80 % нуклеотидів, звичайно по щонайменше 90-95 %, а краще по щонайменше 98-99,5 % нуклеотидів. Альтернативно, суттєва гомологія існує тоді, коли сегменти будуть гібридизуватись за селективних умов гібридизації до комплементу ланцюга.

Відсоток ідентичності між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних позицій, спільних для обох послідовностей (тобто,  $\% \text{ гомології} = \text{кількість ідентичних позицій} / \text{загальна кількість позицій} \times 100$ ), з урахуванням кількості пропусків (і довжини кожного пропуску), які необхідно було ввести для оптимального суміщення двох послідовностей. Порівняння послідовностей і визначення відсотку тотожності між двома послідовностями можуть здійснюватись за допомогою математичного алгоритму, як буде описано далі в Прикладах, що не є обмежувачими.

Відсоток ідентичності між двома нуклеотидними послідовностями можна визначити за допомогою програми GAP в програмному забезпеченні GCG з використанням матриці NWSgapdna CMP, вагового коефіцієнту пропуску 40, 50, 60, 70 чи 80 і вагового коефіцієнту довжини пропуску 1, 2, 3, 4, 5 чи 6. Відсоток ідентичності між двома нуклеотидними чи амінокислотними послідовностями можна визначити також за допомогою алгоритму E. Meyers та W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), який було включено до програми ALIGN (версія 2.0), з використанням таблиці ваги залишків PAM120, штрафу за довжину пропуску 12 і штрафу за пропуск 4. До того ж, Відсоток ідентичності між двома амінокислотними послідовностями можна визначити також за допомогою алгоритму Needleman і Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), який було включено до програми GAP в пакеті програмного забезпечення GCG, з використанням матриці Blossum 62 чи матриці PAM250, вагового коефіцієнту пропуску 16, 14, 12, 10, 8, 6 чи 4 і вагового коефіцієнту довжини пропуску 1, 2, 3, 4, 5 чи 6.

Послідовності нуклеїнових кислот і білків за цим винаходом можуть бути використані також в якості "пошукової послідовності" для здійснення пошуку в загальних базах даних з метою, наприклад, ідентифікації споріднених послідовностей. Такі пошуки можуть здійснюватись за допомогою програм NBLAST і XBLAST (версія 2.0), описаних Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

Нуклеотидні пошуки BLAST можуть здійснюватись за допомогою програми NBLAST, сума балів = 100, розрядність слова = 12, щоб отримати нуклеотидні послідовності, гомологічні молекулам нуклеїнових кислот за цим винаходом. Пошуки білків BLAST можуть здійснюватись за допомогою програми XBLAST, сума балів = 50, розрядність слова = 3, щоб отримати амінокислотні послідовності, гомологічні білковим молекулам за цим винаходом. Щоб досягти суміщень з пропусками для цілей порівняння, можна скористатись програмою Gapped BLAST, описаною Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При використанні програм BLAST і Gapped BLAST можна застосувати стандартні значення параметрів (значення за умовчанням) для відповідних програм (наприклад, XBLAST і NBLAST).

Нуклеїнові кислоти можуть бути присутніми в цілих клітинах, клітинному лізаті чи в частково очищеному або суттєво чистому вигляді. Нуклеїнова кислота є "виділеною" чи "доведеною до суттєвої чистоти", коли її очищено від інших клітинних компонентів чи інших контамінантів, наприклад інших клітинних нуклеїнових кислот чи білків, стандартними методами, включаючи обробку лугом/SDS (SDS = додецилсульфат натрію), CsCl бендинг, колонкову хроматографію, електрофорез в агарозному гелі та інші методи, добре відомі спеціалістам в цій галузі (дивись F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)).

Композиції нуклеїнових кислот за цим винаходом, хоча й часто в нативній послідовності (крім модифікованих сайтів рестрикції і т.п.), з кДНК, геномної ДНК чи їх сумішей можуть бути піддані мутації за стандартними методиками для отримання генних послідовностей. В разі кодуєчих послідовностей такі мутації можуть впливати на амінокислотну послідовність, як це є бажаним. Зокрема, розглядаються послідовності ДНК, суттєво гомологічні нативним постійним ділянкам V, D, J чи похідні від них, переключення та інші такі послідовності, описані тут (термін "похідна" означає, що дана послідовність є ідентичною чи модифікованою з іншої послідовності).

Термін "функціонально пов'язана" стосується послідовності нуклеїнових кислот, що знаходиться у функціональному взаємозв'язку з іншою послідовністю нуклеїнових кислот. Наприклад, ДНК для передпослідовності чи секреторної лідерної послідовності є функціонально пов'язаною з ДНК для поліпептиду, якщо вона експресується як білок-попередник, який приймає участь в секреції даного поліпептиду. Промотор чи енхансер є функціонально пов'язаними з кодуєчою послідовністю, якщо він має вплив на транскрипцію цієї послідовності. Сайт зв'язування рибосоми є функціонально пов'язаним з кодуєчою послідовністю, якщо він позиціонований таким чином, щоб забезпечувати трансляцію. Загалом, "функціональний зв'язок" означає, що послідовності ДНК, будучи зшитими, є суміжними і, у випадку секреторної лідерної послідовності, суміжними також у фазі читування. Однак енхансери не мають бути суміжними. Зшивка здійснюється шляхом лігірування на звичайних сайтах рестрикції. Якщо такі

сайти не існують, то у відповідності до звичної практики використовуються синтетичні олігонуклеотидні адаптери чи лінкери. Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", коли її поставлено у функціональну взаємозалежність з іншою послідовністю нуклеїнових кислот. Наприклад, промотор чи енхансер є функціонально зв'язаним з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію цієї послідовності. По відношенню до регуляторних послідовностей транскрипції функціональний зв'язок означає, що послідовності ДНК, будучи зшитими, є суміжними і, коли необхідно приєднати дві білкові кодуєчі ділянки, суміжними також в рамці зчитування. Для послідовностей переключення функціональний зв'язок означає, що ці послідовності здатні впливати на рекомбінацію на етапі переключення.

Термін "вектор", як він тут використовується, стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою її було зшито. Одним з видів вектору є "плазмід" – кругова двонитчаста петля ДНК, в якій можуть бути зшитими додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектору є вірусний вектор, в якому додаткові сегменти ДНК можуть бути вшиті у вірусний геном. Певні вектори є здатними до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку вони вводяться (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальне походження реплікації, і епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) можуть бути інтегрованими в геном клітини-хазяїна після інтродукції в клітину-хазяїна і, тим самим, бути включеними в реплікацію разом з геномом хазяїна. Більш того, певні вектори є здатними спрямовувати експресію генів, з якими вони функціонально поєднані. Такі вектори називаються тут "рекомбінантними векторами експресії" (або просто "векторами експресії"). Загалом, вектори експресії, які знаходять застосування в технології рекомбінантних ДНК, часто мають вигляд плазмід. Терміни "плазмід" і "вектор" можуть використовуватись взаємозамінно. Однак даний винахід включає інші види векторів експресії, такі як вірусні вектори (наприклад, дефективні щодо реплікації ретровіруси, аденовіруси і адено-асоційовані віруси), які виконують еквівалентні функції.

Термін "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн"), як він тут використовується, стосується клітини, в яку було введено рекомбінантний вектор експресії. Слід розуміти, що ці терміни стосуються не тільки конкретної клітини суб'єкту, а й також потомства такої клітини. Оскільки в наступних генераціях можуть трапитись певні модифікації через мутацію чи вплив оточуючого середовища, таке потомство може, в дійсності, не бути ідентичним материнській клітині, але воно все ще включається в об'єм терміну "клітина-хазяїн", як він тут використовується.

Терміни "лікувати" і "лікування", як вони тут використовуються, стосуються терапевтичних чи профілактичних заходів, описаних тут. Способи "лікування" застосовують введення суб'єкту антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом, наприклад суб'єкту з хворобою чи розладом, асоційованими із залежним від ErbB3 проведенням сигналів, чи схильному до розвитку такої хвороби чи розладу, для того щоб попередити, вилікувати, відстрочити, зменшити тяжкість, пом'якшити один чи більше симптомів такої хвороби чи розладу, або зменшити частоту рецидивування хвороби чи розладу, або подовжити виживання суб'єкта зверх очікуваного за відсутності такого лікування.

Термін "хвороба, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів" чи "розлад, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів", як він тут використовується, включає патологічні стани та/або симптоми, пов'язані з патологічним станом, коли виявляються підвищені рівні ErbB3 та/або активація клітинних каскадів з участю ErbB3. Має бути зрозумілим, що ErbB3 гетеродимеризується з іншими ErbB білками, такими як EGFR і ErbB2, коли виявляються підвищені рівні ErbB3. Відповідно, термін "хвороба, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів" включає також патологічні стани та/або симптоми, пов'язані з патологічним станом, коли виявляються підвищені рівні гетеродимерів EGFR/ErbB3 та/або ErbB2/ErbB3. Загалом, термін "хвороба, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів" стосується будь-якого розладу, початок, прогресування чи персистенція симптомів якого вимагає участі ErbB3. Показові опосередковані ErbB3 розлади включають, але не обмежуються ним, наприклад рак.

Терміни "рак" чи "канцерозний" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який типово характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади раку включають, не обмежуючись ними, карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоми. Більш конкретні приклади раку включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинну карциному легень, недрібноклітинну карциному легень, рак шлунку, рак підшлункової залози, гліальноклітинні пухлини, такі як гліобластома і нейрофіброматоз, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак ободової кишки, меланому, колоректальний рак, карциному ендометрію, карциному слинних залоз, рак нирок, рак



передміхурової залози, рак піхви, рак щитовидної залози, карциному печінки і різні види раку голови і шиї. В одному конкретному варіанті здійснення даного винаходу рак, що лікується чи діагностується з використанням способів за цим винаходом, вибирається з меланоми, раку молочної залози, раку яєчника, світлоклітинного раку, раку шлунково-кишкового тракту/товстої кишки, раку легень і раку передміхурової залози.

Термін "ефективна кількість", як він тут використовується, стосується такої кількості антитіла чи його частини, що зв'язує ErbB3, якої достатньо для здійснення лікування, прогнозування чи діагностування хвороби, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів, як тут описано, коли вона вводиться суб'єкту. Терапевтично ефективна кількість буде варіювати в залежності від суб'єкту і патологічного стану, який лікується, маси тіла і віку суб'єкту, тяжкості патологічного стану, способу введення і т.п. і легко визначається спеціалістами в цій галузі. Дози для введення можуть коливатись, наприклад, від приблизно 1 нг до приблизно 10000 мг, від приблизно 5 нг до приблизно 9500 мг, від приблизно 10 нг до приблизно 9000 мг, від приблизно 20 нг до приблизно 8500 мг, від приблизно 30 нг до приблизно 7500 мг, від приблизно 40 нг до приблизно 7000 мг, від приблизно 50 нг до приблизно 6500 мг, від приблизно 100 нг до приблизно 6000 мг, від приблизно 200 нг до приблизно 5500 мг, від приблизно 300 нг до приблизно 5000 мг, від приблизно 400 нг до приблизно 4500 мг, від приблизно 500 нг до приблизно 4000 мг, від приблизно 1 мкг до приблизно 3500 мг, від приблизно 5 мкг до приблизно 3000 мг, від приблизно 10 мкг до приблизно 2600 мг, від приблизно 20 мкг до приблизно 2575 мг, від приблизно 30 мкг до приблизно 2550 мг, від приблизно 40 мкг до приблизно 2500 мг, від приблизно 50 мкг до приблизно 2475 мг, від приблизно 100 мкг до приблизно 2450 мг, від приблизно 200 мкг до приблизно 2425 мг, від приблизно 300 мкг до приблизно 2000 мг, від приблизно 400 мкг до приблизно 1175 мг, від приблизно 500 мкг до приблизно 1150 мг, від приблизно 0,5 мг до приблизно 1125 мг, від приблизно 1 мг до приблизно 1100 мг, від приблизно 1,25 мг до приблизно 1075 мг, від приблизно 1,5 мг до приблизно 1050 мг, від приблизно 2,0 мг до приблизно 1025 мг, від приблизно 2,5 мг до приблизно 1000 мг, від приблизно 3,0 мг до приблизно 975 мг, від приблизно 4,0 мг до приблизно 925 мг, від приблизно 4,5 мг до приблизно 900 мг, від приблизно 5 мг до приблизно 875 мг, від приблизно 10 мг до приблизно 850 мг, від приблизно 20 мг до приблизно 825 мг, від приблизно 30 мг до приблизно 800 мг, від приблизно 40 мг до приблизно 775 мг, від приблизно 50 мг до приблизно 750 мг, від приблизно 100 мг до приблизно 725 мг, від приблизно 200 мг до приблизно 700 мг, від приблизно 300 мг до приблизно 675 мг, від приблизно 400 мг до приблизно 650 мг, приблизно 500 мг чи від приблизно 525 мг до приблизно 625 мг антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом. Схеми прийому лікарського засобу можуть регулюватись таким чином, щоб забезпечувати оптимальну терапевтичну реакцію. Ефективна кількість є також такою, при якій будь-які токсичні чи ушкоджуючі ефекти (тобто, побічні ефекти) антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, мінімізуються та/або переважаються корисними ефектами.

Термін "пацієнт" включає людину та інших суб'єктів-ссавців, які приймають профілактичне чи терапевтичне лікування.

Термін "суб'єкт", як він тут використовується, включає людину чи будь-яку тварину. Наприклад, способи і композиції за цим винаходом можуть бути використані для лікування суб'єкта, що має рак. В конкретному варіанті здійснення суб'єктом є людина. Тварини, що не відносяться до людини, включають всіх хребетних, наприклад ссавців і не ссавців, таких як примати, вівці, собаки, корови, кури, амфібії, рептилії і т.д.

Термін "зразок" стосується тканини, рідини організму чи клітини від пацієнта чи суб'єкта. Звичайно, тканину чи клітину можна взяти у пацієнта, але діагностика *in vivo* також мається на увазі. У випадку солідної пухлини зразок тканини може бути взятий з хірургічно видаленої пухлини і підготовлений до дослідження звичайними методами. У випадку лімфом і лейкомії можуть бути отримані і відповідно підготовлені для дослідження лімфоцити, лейкозні клітини чи лімфатичні тканини. Інші зразки від пацієнта, включаючи сечу, слізу рідину, сироватку, цереброспінальну рідину, фекалії, мокротиння, екстракти клітин і т.п., також можуть бути корисними у випадку певних пухлин.

Терміни "протираковий препарат" і "antineoplastичний препарат" стосуються лікарських препаратів, які використовуються для лікування неоплазій, таких як ракові пухлини. Медикаментозна терапія може використовуватись самостійно або в комбінації з іншими видами лікування, такими як хірургія чи променева терапія. Кілька класів лікарських препаратів можуть знайти використання в лікуванні раку в залежності від природи ураженого органу. Наприклад, рак молочної залози звичайно викликається естрогенами і може лікуватись препаратами, які інактивують ці статеві гормони. Подібно до цього, рак передміхурової залози може лікуватись

препаратами, які інактивують андрогени, чоловічий статевий гормон. Протиракові препарати за цим винаходом включають, серед інших, наступні препарати:

Протираковий препарат	Коментарі	Приклади
Антитіла (а) антитіла інші ніж анти-ErbB3 антитіла; і (б) анти-ErbB3 антитіла, які зв'язують різні епітопи	Антитіла, які зв'язують IGF-1R (рецептор інсулін подібного фактору росту типу 1), який експресується на поверхні клітини більшості раків людини.	A12 (повністю гуманізоване mAb) 19D12 (повністю гуманізоване mAb) CP751-871 (повністю гуманізоване mAb) H7C10 (гуманізоване mAb) alphaIR3 (миша) scFV/FC (миша/людина химера) EM/164 (миша)
	Антитіла, які зв'язують EGFR (рецептор епідермального фактору росту); Мутації, які впливають на експресію чи активність EGFR, можуть призводити до раку.	Matuzumab (EMD72000) Erbix® / Cetuximab (Imclone) Vectibix® / Panitumumab (Amgen) mAb 806 Nimotuzumab (TheraCIM)
	Антитіла, які зв'язують cMET (мезенхімальний фактор епітеліального переходу); представник родини MET рецепторних тирозинкіназ.	AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5D5) (Genentech)
	Анти-ErbB3 антитіла, які зв'язують різні епітопи.	Ab #14 (MM 121-14) описаний тут, Herceptin® (Trastuzumab; Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG)
Малі молекули, націлені на IGF1R	IGF-1R (рецептор інсулін подібного фактору росту типу 1), який експресується на поверхні клітини більшості раків людини.	NVP-AEW541-A BMS-536,924 (1H-бензоімідазол-2-іл)-1H-пирідин-2-он) BMS-554,417 Cycloligan TAE226 PQ401
Малі молекули, націлені на EGFR	EGFR (рецептор епідермального фактору росту); Мутації, які впливають на експресію чи активність EGFR, можуть призводити до раку.	Iressa® / Gefitinib (AstraZeneca) CI-1033 (PD 183805) (Pfizer) Lapatinib (GW-572016) (GlaxoSmithKline) Tykerb® / Lapatinib Ditosylate (SmithKline Beecham) Tarceva®/ Erlotinib HCL (OSI-774) (OSI Pharma) PKI-166 (Novartis) PD-158780 EKB-569 Tyrphostin AG 1478(4-(3-хлораніліно)-6,7-диметоксихіназолін)
Малі молекули, націлені на cMET	cMET (мезенхімальний фактор епітеліального переходу); представник родини MET рецепторних тирозинкіназ.	PHA665752 ARQ 197

Антиметаболіти	<p>Антиметаболіт – це хімічна Фторурацил (5-FU) сполука зі структурою, Capecitabine / XELODA® (HLR Roche) подібною до субстанції 5-Трифторметил-2'-деоксиуридин (метаболіта), необхідної для Натрієва сіль метотрексату (Trexall) (Barr) нормальних біохімічних Raltitrexed / Tomudex® (AstraZaneca) реакцій, і все-таки достатньо Pemetrexed / Alimta® (Lilly) відмінною, щоб впливати на Tegafur нормальні функції клітин, Цитозин арабінозид (Cytarabine, Ara-C) / Thioguanine® (GlaxoSmithKline) включаючи поділ клітин.</p> <p>5-азацитидин 6-меркаптопурин (Mercaptopurine, 6-MP) Азатиоприн / Azasan® (AAIPHARMA LLC) 6-тіогуанін (6-TG) / Purinethol® (TEVA) Пентостатин / Nipent® (Hospira Inc.) Флударабін фосфат / Fludara® (Bayer Health Care) Cladribine (2-CdA, 2-хлордеоксиаденозин) / Leustatin® (Ortho Biotech)</p>
Алкилюючі препарати	<p>Алкилюючий Інгібітор рибонуклеотидредуктази (RNR) антинеопластичний препарат Циклофосфамід / Cytoxan (BMS) – це алкилюючий агент, який Neosar (TEVA) приєднує алкільну групу до Іфосфамід / Mitoxana® (ASTA Medica) ДНК. Оскільки ракові клітини Тіотена (Bedford, Abraxis, Teva) загалом проліферують BCNU→ 1,3-bis(2-хлоретил)-1-необмежено більше, ніж нітрозосечовина здорові клітини, вони є більш CCNU→ 1,3-bis(2-хлоретил)-3-циклогексил-1-чутливими до ушкодження нітрозосечовина (метил CCNU) ДНК, і алкилюючі препарати Гексаметилмеламін (Altretamine, HMM) / використовуються в клініці для Нехален® (MGI Pharma Inc.) лікування широкого кола Бусульфан / Myleran (GlaxoSmithKline) пухлин.</p> <p>Прокарбазин HCL / Matulane (Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc.) Дакарбазин (DTIC) Хлорамбуцил / Leukaran® (SmithKline Beecham) Мелфалан / Alkeran® (GlaxoSmithKline) Цисплатин (Cisplatinum, CDDP) / Platinol (Bristol Myers) Карбоплатин / Paraplatin (BMS) Оксаліплатин / Eloxitan® (Sanofi-Aventis US)</p>
Інгібітори топоізомерази	<p>Інгібітори топоізомерази – це хіміотерапевтичні препарати, призначені для порушення дії топоізомеразних ферментів (топоізомерази I і II), що є ферментами, які контролюють зміни в структурі ДНК, каталізуючи розрив і возз'єднання фосфодиефірного каркасу ниток ДНК під час нормального клітинного циклу.</p> <p>Doxorubicin HCL / Doxil® (Alza) Daunorubicin citrate / Daunoxome® (Gilead) Mitoxantrone HCL/Novantrone (EMD Serono) Actinomycin D Etoposide / Vepesid® (BMS)/ Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, Etc.) Topotecan HCL / Hycamtin® (GlaxoSmithKline) Teniposide (VM-26) / Vumon® (BMS) Irinotecan HCL(CPT-11) / Camptosar® (Pharmacia &amp; Upjohn)</p>

Препарати, націлені на мікротрубки	Мікротрубки є одним з компонентів цитоскелету. Вони мають діаметр біля 24 нм і довжину від кількох мікрметрів до, можливо, міліметрів в аксонах нервових клітин. Мікротрубки слугують структурними компонентами в клітинах і задіяні в багатьох клітинних процесах, включаючи мітоз, цитокінез і везикулярний транспорт.	Вінкристин / Oncovin® (Lilly) Вінбластин сульфат / Velban® (вже не випускається) (Lilly) Вінорелбін тартрат / Navelbine® (PierreFabre) Віндезин сульфат / Eldisine® (Lilly) Паклітаксель / Taxol® (BMS) Доцетаксель / Taxotere® (Sanofi Aventis США) Паклітаксель в наночастках (ABI-007) / Abraxane® (Abraxis BioScience, Inc.) Ixabepilone / IXEMPRA™ (BMS)
Інгібітори кіназ	Тирозинкінази є ферментами всередині клітини, функція яких полягає в приєднанні фосфатних груп до амінокислоти тирозин. Блокуючи здатність протеїнтирозинкіназ функціонувати, ці сполуки є інструментом для контролю канцерозного росту клітин.	Imatinib mesylate / Gleevec (Novartis) Sunitinib malate / Sutent® (Pfizer) Sorafenib tosylate / Nexavar® (Bayer) Nilotinib hydrochloride monohydrate / Tasisign® (Novartis)
Інгібітори синтезу білку	Викликають апоптоз клітин	L-аспарагіназа / Elspar® (Merck & Co.)
Імунотерапевтичні препарати	Індукують у онкологічних пацієнтів імунну реактивність	Альфа інтерферон Інгібітор ангіогенезу / Avastin® (Genentech) IL-2→ Інтерлейкін 2 (Aldesleukin) / Proleukin® (Chiron) IL-12→ Інтерлейкін 12
Гормони	Гормональна терапія, асоційована з менопаузою і старінням, намагається збільшити кількість певних гормонів в організмі, щоб компенсувати вікове чи пов'язане з хворобою зниження їх рівнів. Гормональна терапія як лікування раку знижує рівень певних гормонів чи змінює здатність раку використовувати ці гормони для росту і поширення.	Тореміфен цитрат / Fareston® (GTX, Inc.) Fulvestrant / Faslodex® (AstraZeneca) Raloxifene HCL / Evista® (Lilly) Anastrozole / Arimidex® (AstraZeneca) Letrozole / Femara® (Novartis) Fadrozole (CGS 16949A) Exemestane / Aromasin® (Pharmacia & Upjohn) Лейпролід ацетат / Eligard® (QTL США) Lupron® (TAP Pharm.) Госерелін ацетат / Zoladex® (AstraZeneca) Triptorelin pamoate / Trelstar® (Watson Labs) Buserelin / Suprefact® (Sanofi Aventis) Nafarelin Cetrorelix / Cetrotide® (EMD Serono) Bicalutamide / Casodex® (AstraZeneca) Nilutamide / Nilandron® (Aventis Pharm.) Мерестрол ацетат / Megace® (BMS) Аналоги соматостатину (Октреотид ацетат / Sandostatin® (Novartis))

Глюкокортикоїди	Протизапальні препарати, які використовуються для зменшення набряку, що спричинює раковий біль.	Преднізолон Дексаметазон / Decadron® (Wyeth)
Інгібітори ароматози	Включають імідазоли	Кетоконазол
Інгібітори mTOR	Сигнальний шлях mTOR було спершу відкрито під час досліджень імуносупресивного препарату рапаміцин. Цей дуже консервативний сигнальний шлях регулює проліферацію і метаболізм клітин у відповідь на дію чинників оточуючого середовища, проводячи сигнали рецептору фактору росту клітини через фосфоінозитид-3-кіназу (PI-3K) для клітинного росту, проліферації і ангиогенезу.	Sirolimus (Rapamycin) / Rapamune® (Wyeth) Temsirolimus (CCI-779) / Torisel® (Wyeth) Deforolimus (AP23573) (Ariad Pharm.) Everolimus (RAD001) / Certican® (Novartis)
Хіміотерапевтичні препарати		Адріаміцин, 5-Фторурацил, Цитоксин, Блеоміцин, Мітоміцин С, Дауноміцин, Карміноміцин, Аміноптерин, Дактиноміцин, Мітоміцини, Еспераміцини

Один чи більше протиракових препаратів можуть вводиться одночасно з введенням антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом, до такого введення чи після нього.

5

Різні аспекти даного винаходу описуються більш докладно в наступних підрозділах.

II. Способи отримання антитіл за цим винаходом

(i) Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла за цим винаходом можуть бути отримані за допомогою різних відомих методів, таких як стандартний метод гібридизації соматичних клітин, описаний Kohler і Milstein (1975) Nature 256: 495, вірусна чи онкогенна трансформація В лімфоцитів чи метод фагового дисплею з використанням бібліотек генів антитіл людини. В певних варіантах здійснення даного винаходу такі антитіла є повністю моноклональними антитілами людини.

10

Відповідно, в одному варіанті здійснення, для отримання антитіла, яке зв'язує ErbB3, використовується гібридомний метод. За цим методом мишу чи іншу відповідну тварину-хазяїна імунізують відповідним антигеном, щоб отримати лімфоцити, які продукують чи здатні продукувати антитіла, що специфічно зв'язуються з тим антигеном, який було використано для імунізації. Як варіант, лімфоцити можуть бути імунізовані in vitro. Потім лімфоцити можуть бути злиті з мієломними клітинами, для чого використовується відповідний фактор, що викликає злиття клітин, такий як поліетилен гліколь, з утворенням клітини гібридами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Культуральне середовище, в якому вирощуються клітини гібридами, досліджують на продукцію моноклональних антитіл, спрямованих проти даного антигену. Після ідентифікації клітин гібридами, що продукують антитіла бажаної специфічності, афінності та/або активності, відповідні клони можуть бути субклоновані методами серійного розведення і можуть вирощуватись стандартними методами (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Придатні для цієї мети культуральні середовища включають, наприклад, D-MEM чи середовище RPMI-1640. Крім того, клітини гібридами можуть вирощуватись in vivo як асцитні пухлини у тварини. Моноклональні антитіла, секретовані такими субклонами, можуть біти відділені від культурального середовища, асцитної рідини чи сироватки звичайними методами очистки імуноглобуліну, такими як, наприклад, протеїн А-Сефарозна, гідроксилапатитна хроматографія, гелі-електрофорез, діаліз чи афінна хроматографія.

15

20

25

30

35

В іншому варіанті здійснення антитіла і частини антитіл, що зв'язують ErbB3, можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл, створених з використанням методів, описаних, наприклад, McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), Marks et

al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) та Hoet et al (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348; патенти США №№ 5,223,409; 5,403,484; і 5,571,698, видані Ladner et al.; патенти США №№ 5,427,908 і 5,580,717, видані Dower et al.; патенти США №№ 5,969,108 і 6,172,197, видані McCafferty et al.; і патенти США №№ 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 і 6,593,081, видані Griffiths et al... Додатково, може бути використана також продукція антитіл людини з високою афінністю (нМ діапазон) за допомогою перестановки ланцюгів (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), а також комбінаторної інфекції і рекомбінації in vivo як стратегії для створення дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)).

В одному конкретному варіанті здійснення моноклональне антитіло чи його частина, що зв'язує ErbB3, отримується за допомогою методу фагового дисплею, описаного Hoet et al., supra. Цей метод передбачає генерацію бібліотеки Fab людини, що містить унікальну комбінацію імуноглобулінових послідовностей, виділених від донорів-людей, із забезпеченою синтезом різноманітністю ділянок CDR важкого ланцюга. З цієї бібліотеки потім вибирають Fabs, які зв'язуються з ErbB3.

В ще іншому варіанті здійснення моноклональні антитіла людини, спрямовані проти ErbB3, можуть бути отримані з використанням трансгенних чи трансхромосомних мишей, які несуть швидше частини імунної системи людини, ніж систему миші (дивись, наприклад, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. et al. (1994), supra; рецензовану в книзі Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, а також Harding, F. і Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546. Дивись також патенти США №№ 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; і 5,770,429; всі видані Lonberg і Kay; патент США № 5,545,807, виданий Surani et al.; публікації PCT №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 і WO 99/45962, всі від Lonberg і Kay; і публікацію PCT № WO 01/14424 від Korman et al.).

В іншому варіанті здійснення антитіла людини за цим винаходом можуть бути отримані з використанням миші, яка несе імуноглобулінові послідовності людини на трансгенах і трансхромосомах, такої як миша, яка несе трансген важкого ланцюга людини і трансхромосому легкого ланцюга людини (дивись, наприклад, публікацію PCT WO 02/43478 від Ishida et al.).

Відомі в цій галузі альтернативні системи на трансгенних тваринах, що експресують імуноглобулінові гени людини, також можуть бути використані для отримання анти-ErbB3 антитіл за цим винаходом. Наприклад, можна скористатись альтернативною трансгенною системою під назвою Xenomouse (Abgenix, Inc.); такі миші описані, наприклад, в патентах США №№ 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 і 6,162,963, виданих Kucherlapati et al.

Більш того, відомі в цій галузі альтернативні трансхромосомні системи у тварин, що експресують імуноглобулінові гени людини, також можуть бути використані для отримання анти-ErbB3 антитіл за цим винаходом. Наприклад, можуть бути використані миші, що несуть і трансхромосому важкого ланцюга людини, і трансхромосому легкого ланцюга людини, як описано Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Крім того, описані корови, що несуть трансхромосоми важкого і легкого ланцюга людини (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894), які теж можуть бути використані для отримання анти-ErbB3 антитіл за цим винаходом.

В ще іншому варіанті здійснення антитіла за цим винаходом можуть бути отримані за допомогою трансгенної рослини та/або культивованих клітин рослини (такої як, наприклад, тютюн, кукурудза і ряска), які продукують такі антитіла. Наприклад, листя трансгенного тютюну, що експресує антитіла чи його частини, що зв'язують антиген, може бути використане для отримання таких антитіл за допомогою, наприклад, індукованого промотору (дивись, наприклад, Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95 118 (1999)). Трансгенна кукурудза також може бути використана для експресії таких антитіл і їх частин, що зв'язують антиген (дивись, наприклад, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127 147 (1999)). Антитіла можуть отримуватись у великих кількостях також з насіння трансгенних рослин, включаючи частини антитіл, такі як однокланові антитіла (scFv's), наприклад, при використанні насіння тютюну і бульб картоплі (дивись, наприклад, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101 109 (1998)). Методи отримання антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, з рослин описані також в інших джерелах, наприклад Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99 108 (1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522 7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341 6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940 944 (1994) та патенти США №№ 6,040,498 і 6,815,184.

Специфічність зв'язування моноклональних антитіл чи їх частин, що зв'язують ErbB3, отриманих будь-яким способом, включаючи способи, описані тут, може бути визначена за

допомогою методу імунної преципітації або аналізу зв'язування *in vitro*, такого як радіоімунологічне дослідження (RIA) чи твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA). Афінність моноклонального антитіла чи його частини до зв'язування можна оцінити за допомогою аналізу Scatchard (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)).

В певних варіантах здійснення даного винаходу антитіло ErbB3 чи його частина, отримані будь-яким з описаних вище методів, можуть бути піддані подальшим змінам чи оптимізації для досягнення бажаної специфічності зв'язування та/або афінності, для чого можуть бути використані методи, відомі в цій галузі, такі як описані тут.

В одному варіанті здійснення для отримання структурно і функціонально споріднених антитіл можуть бути використані часткові послідовності антитіла, похідні від антитіла ErbB3. Наприклад, антитіла взаємодіють з цільовими антигенами головним чином через амінокислотні залишки, які знаходяться на шести ділянках, що визначають комплементарність (CDR), важкого і легкого ланцюгів. З цієї причини амінокислотні послідовності в межах CDR більше відрізняються між окремими антитілами, ніж послідовності поза CDR. Оскільки послідовності CDR є відповідальними за більшість взаємодій антитіло-антиген, то існує можливість експресії рекомбінантних антитіл, які імітують властивості специфічних антитіл природного походження, якщо створити вектори експресії, які включають послідовності CDR від специфічного антитіла природного походження, перенесені на каркасні послідовності від іншого антитіла з іншими властивостями (дивись, наприклад, Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321:522-525; та Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). Такі каркасні послідовності можна отримати із загальних баз даних щодо ДНК, які включають зародкові послідовності гену антитіла.

Отже, одна чи більше структурні особливості анти-ErbB3 антитіла за цим винаходом, такі як CDR, можуть бути використані для створення структурно споріднених анти-ErbB3 антитіл, які зберігають щонайменше одну функціональну властивість антитіла за цим винаходом, наприклад властивість пригнічувати опосередковану EGF-подібним лігандом фосфориляцію ErbB3; властивість пригнічувати опосередковане одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну проведення сигналів через ErbB3; властивість пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3; та/або властивість знижувати рівні ErbB3 на поверхні клітин.

В одному конкретному варіанті здійснення одна чи більше ділянок CDR, вибраних з SEQ ID №:7-12, SEQ ID №:13-18, SEQ ID №:19-24, SEQ ID №:39-44, and SEQ ID №:45-50, рекомбінантно комбінуються з відомими каркасними ділянками і ділянками CDR людини для створення додаткових, рекомбінантно сконструйованих анти-ErbB3 антитіл за цим винаходом. Варіабельні каркасні ділянки важкого і легкого ланцюгів можуть отримуватись з тієї самої або з різних послідовностей антитіла.

Спеціалістам в цій галузі добре відомо, що домени CDR3 важкого і легкого ланцюгів антитіла відіграють особливо важливу роль в специфічності зв'язування/афінності антитіла щодо антигену (дивись Hall et al., *J. Immunol.*, 149:1605-1612 (1992); Polymenis et al., *J. Immunol.*, 152:5318-5329 (1994); Jahn et al., *Immunobiol.*, 193:400-419 (1995); Klimka et al., *Brit. J. Cancer*, 83:252-260 (2000); Beiboer et al., *J. Mol. Biol.*, 296:833-849 (2000); Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2161-2162 (1994); Ditzel et al., *J. Immunol.*, 157:739-749 (1996)). Відповідно, в певних варіантах здійснення генеруються антитіла, які включають CDR3 важкого та/або легкого ланцюга конкретних антитіл, описаних тут (наприклад, SEQ ID №:9, 15, 21, 41, 47 та/або SEQ ID №:12, 18, 24, 44, 50). Такі антитіла можуть додатково включати CDR1 та/або CDR2 важкого та/або легкого ланцюга антитіла за цим винаходом (наприклад, SEQ ID №:7-8 та/або SEQ ID №:10-11; SEQ ID №:13-14 та/або SEQ ID №:16-17; SEQ ID №:20-21 та/або SEQ ID №:22-23; SEQ ID №:39-40 та/або SEQ ID №:42-43; or SEQ ID №:45-46 та/або SEQ ID №:48-49).

Ділянки CDR1, 2, та/або 3 описаних вище сконструйованих антитіл можуть включати точну амінокислотну послідовність (послідовності), як та, що описана тут (наприклад, ділянки CDR Ab №6, Ab №3, Ab №14, Ab №17 чи Ab №19, показані в SEQ ID №:7-12, 13-18, 19-24, 39-44 і 45-50, відповідно). Однак спеціалістам в цій галузі має бути очевидно, що можливі певні відхилення від точних послідовностей CDR при збереженні здатності такого антитіла ефективно зв'язувати ErbB3 (наприклад, консервативні амінокислотні заміщення). Відповідно, в іншому варіанті здійснення, сконструйоване антитіло може включати одну чи більше ділянок CDR, які є, наприклад, на 90 %, 95 %, 98 %, 99 % чи 99,5 % ідентичними одній чи більше ділянок CDR Ab №6, Ab №3 чи Ab №14.

В іншому варіанті здійснення один чи більше залишків CDR можуть бути змінені з метою модифікувати зв'язування для досягнення більш сприятливої швидкості зв'язування. У такий спосіб можна створити антитіло, що має надвисоку афінність до зв'язування, наприклад  $10^{10} \text{ M}^{-1}$

чи більше. Методи дозрівання афінності, добре відомі в цій галузі і ті, що описані тут, можуть бути використані для того, щоб змінити ділянку (ділянки) CDR і відібрати серед отриманих молекул ті, які демонструють бажану зміну щодо зв'язування. Відповідно, коли ділянки CDR змінюються, зміни в афінності зв'язування, а також в імуногенності можуть контролюватись і оцінюватись таким чином, щоб отримане антитіло було оптимізованим щодо найкращої комбінації зв'язування і низької імуногенності.

На додачу до модифікацій в ділянках CDR, чи замість них, модифікації можуть вноситись також в одну чи більше каркасних ділянок FR1, FR2, FR3 і FR4 варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюга антитіла, якщо ці модифікації не знищують афінність цього антитіла до зв'язування.

В іншому варіанті здійснення антитіло модифікується далі у відношенні ефекторної функції з тим, щоб посилити ефективність цього антитіла, наприклад в лікуванні раку. Так, в ділянку Fc може бути введений цистеїнів залишок (залишки), що забезпечує утворення на цій ділянці дисульфідного зв'язку між ланцюгами. Гомодимерне антитіло, яке створюється при цьому, може мати поліпшену здатність до інтерналізації та/або посилені опосередкований комплементом лізис клітин і залежну від антитіла клітинну цитотоксичність (ADCC). Дивись Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Гомодимерні антитіла з посиленою протипухлинною активністю можуть бути отримані також з використанням гетеробіфункціональних крослінкерів, як описано в статті Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Як варіант, можна сконструювати антитіло, що має подвійні ділянки Fc і, відповідно, посилену здатність щодо опосередкованого комплементом лізису клітин і залежної від антитіла клітинної цитотоксичності (ADCC). Дивись Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Даний винахід охоплює також біспецифічні антитіла та імунокон'югати, як докладніше буде описано далі.

#### (ii) Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла за цим винаходом включають щонайменше одну специфічність зв'язування для ErbB3 і щонайменше одну специфічність зв'язування для іншого антигену, такого як продукт онкогену. Біспецифічні антитіла можуть бути отримані як антитіла повної довжини або як фрагменти антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла F(ab')<sub>2</sub>).

Методи отримання біспецифічних антитіл є добре відомими в цій галузі (дивись, наприклад, публікації WO 05117973 і WO 06091209). Наприклад, отримання біспецифічних антитіл повної довжини може базуватись на коекспресії двох пар важкий ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну, причому ці два ланцюги мають різні специфічності (дивись, наприклад, Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Більш докладний опис отримання біспецифічних антитіл можна знайти, наприклад, в таких джерелах, як Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986) та Brennan et al., Science, 229: 81 (1985), в яких описано процес хімічного зв'язку для отримання біспецифічних антитіл. Описані також різні методи для отримання і виділення фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла отримувались з використанням лейцинових "блискавок" (дивись, наприклад, Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)). Повідомлялось також про іншу стратегію отримання фрагментів біспецифічних антитіл з використанням одноланцюгових димерів Fv (sFv) (дивись, наприклад, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)).

В одному конкретному варіанті здійснення даного винаходу біспецифічне антитіло включає перше антитіло або його зв'язувальну частину, яка зв'язує ErbB3, і друге антитіло або його зв'язувальну частину, яка зв'язується з ErbB2, ERbB3, ErbB4, EGFR, IGF1-R, C-MET, Lewis Y, MUC-1, ErCAM, CA125, специфічним мембранним антигеном передміхурової залози, PDGFR-α, PDGFR-β, C-KIT або будь-яким з FGF рецепторів.

#### (iii) Імунокон'югати

Імунокон'югати за цим винаходом можуть бути отримані шляхом кон'югації описаних тут антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, з іншим терапевтичним препаратом. Відповідні препарати включають, наприклад, цитотоксичний препарат (наприклад, хіміотерапевтичний препарат), токсин (наприклад, ферментативно активний токсин бактеріального, грибового, рослинного чи тваринного походження або його фрагменти) та/або радіоактивний ізотоп (тобто, радіокон'югат). Хіміотерапевтичні препарати, придатні для використання в отриманні таких імунокон'югатів, були описані раніше. Придатні для використання ферментативно активні токсини і їх фрагменти включають А ланцюг дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, А ланцюг екзотоксину (від *Pseudomonas aeruginosa*), А ланцюг рицину, А ланцюг абрину, А ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантину, білки *Phytolaca Americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор *momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор



saraonaria officinalis, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Для отримання радіокон'югованих анти-ErbB3 антитіл підходить широке коло радіонуклідів. Приклади включають  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ .

Імунокон'югати за цим винаходом можуть бути отримані з використанням широкого кола біфункціональних білкових зв'язувальних агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональних похідних імідоефірів (таких як диметиладипімідат HCl), активних ефірів (таких як дисукцинімідил суберат, альдегідів (таких як глютаральдегід), сполук bis-азидо (таких як bis(p-азидобензоїл) гександіамін), похідних bis-діазонію (таких як bis-(p-діазонійбензоїл)-етилендіамін), похідних діазонію (таких як діазонійбензоїл)-етилендіамін), дізоціанатів (таких як толуол 2,6-дізоціанат). Наприклад, рициновий імунотоксин можна отримати, як описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізотіоціанатобензил-3-метилдиетилен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є показовим хелатоутворюючим агентом для кон'югації радіонуклеотиду до антитіла (дивись, наприклад, WO94/11026).

### III. Методи відбору антитіл за цим винаходом

Після отримання антитіл чи їх частин, що зв'язують ErbB3, такі антитіла чи їх частини мають пройти відбір за різними властивостями, такими як описані тут, з використанням численних аналізів, які є добре відомими в цій галузі.

В одному варіанті здійснення даного винаходу антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, проходять відбір на здатність пригнічувати опосередковану EGF-подібним лігандом фосфориляцію ErbB3. Це можна здійснити, обробивши клітини, що експресують ErbB3, EGF-подібним лігандом в присутності і за відсутності даного антитіла чи його частин, що зв'язують антиген. Потім ці клітини піддають лізису, і неочищені лізати центрифугують, щоб видалити нерозчинний матеріал. Фосфориляцію ErbB3 можна оцінити за допомогою, наприклад, вестерн блотингу з наступним дослідженням анти-фосфотирозиним антитілом, як описано в Kim et al., supra і в подальших Прикладах.

В інших варіантах здійснення антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, піддаються подальшому відбору за однією чи більше з наступних властивостей: (1) здатність пригнічувати опосередковане ErbB3-лігандом (наприклад, херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном) проведення сигналів через ErbB3; (2) здатність пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3; (3) здатність знижувати рівні ErbB3 на поверхнях клітин (наприклад, викликаючи інтерналізацію ErbB3); (4) здатність пригнічувати секрецію VEGF клітинами, що експресують ErbB3; (5) здатність пригнічувати міграцію клітин, що експресують ErbB3; та/або (7) здатність зв'язуватись з епітопом, що розміщується на домені I ErbB3. Кожну з цих властивостей можна легко оцінити за допомогою методів, відомих в цій галузі, і тих, що описані тут.

Пригнічення опосередкованого одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну проведення сигналів через ErbB3 можна легко оцінити за допомогою рутинних аналізів, таких як описані в Horst et al. supra. Наприклад, здатність антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, пригнічувати опосередковане херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном проведення сигналів через ErbB3 можна оцінити за допомогою аналізів активності кінази щодо відомих субстратів ErbB3, таких як, наприклад, SHC і PI3K, як описано, наприклад, в Horst et al. supra, Sudo et al., (2000) Methods Enzymol, 322:388-92; and Morgan et al. (1990) Eur. J. Biochem., 191:761-767, після стимуляції одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну. Відповідно, клітини, що експресують ErbB3, можуть стимулюватись одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну та інкубуватись з антитілом-кандидатом чи його частиною, що зв'язує антиген.

Отримані з таких клітин лізати можуть бути піддані імунопреципітації антитілом до субстрату ErbB3 (або білку на шляху клітинного метаболізму за участі ErbB3), такого як, наприклад, анти-JNK-1 антитіло, і досліджені на активність кінази (наприклад, активність JNK кінази чи активність PI3-кінази) за допомогою методів, відомих в цій галузі. Зниження рівня чи повне зникнення активності (наприклад, активності кінази) субстрату ErbB3 чи білку на шляху клітинного метаболізму за участі ErbB3 в присутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, по відношенню до рівня активності за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, є свідченням того, що це антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, пригнічує опосередковане одним чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну проведення сигналів.

В певних варіантах здійснення даного винаходу антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, пригнічує опосередковане ErbB3-лігандом (наприклад, херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном) проведення сигналів, зменшуючи зв'язування одного чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну з ErbB3.

Для того, щоб відібрати ті антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, які пригнічують зв'язування одного чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну з ErbB3, клітини, що експресують ErbB3 (наприклад, клітини MALME-3М, як описано в Прикладах далі), можуть бути приведені в контакт з міченим ErbB3-лігандом (наприклад, радіоактивно міченим херегуліном, епірегуліном, епігеном чи бірегуліном) за відсутності (контроль) чи в присутності анти-ErbB3 антитіла чи його частини, що зв'язує антиген. Якщо антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, пригнічує зв'язування херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну з ErbB3, то буде спостерігатись статистично достовірне зменшення кількості відновленої мітки (наприклад, радіоактивно міченого херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) по відношенню до кількості за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген.

Антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, можуть пригнічувати зв'язування ErbB3-ліганду (наприклад, херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) будь-яким механізмом. Наприклад, антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, можуть пригнічувати зв'язування ErbB3-ліганду (наприклад, одного чи більше з херегуліну, епірегуліну, епігену чи бірегуліну) до ErbB3 за рахунок зв'язування до того самого сайту чи сайту, що накладається, на ErbB3, що й ErbB3 ліганд. Як варіант, антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, можуть пригнічувати зв'язування ErbB3-ліганду, змінюючи чи спотворюючи конформацію ErbB3, що робить його нездатним зв'язуватись з ErbB3 лігандом.

Антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, які знижують рівні ErbB3 на поверхні клітин, можуть бути ідентифіковані за їх здатністю регулювати на пониження ErbB3 на пухлинних клітинах. В певних варіантах здійснення антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, зменшують поверхневу експресію клітинами ErbB3 за рахунок індукції інтерналізації (чи збільшення ендоцитозу) ErbB3. Щоб довести це, ErbB3 може бути біотинильованим, і кількість молекул ErbB3 на поверхні клітин може бути легко визначена, наприклад шляхом визначення кількості біотину на моношарі клітин в культурі в присутності чи за відсутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, наприклад як описано у Waterman et al., J. Biol. Chem. (1998), 273:13819-27, наступної імунопреципітації ErbB3 і дослідження стрептавідином. Зниження виявлення біотинильованого ErbB3 з часом в присутності антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, є свідченням того, що дане антитіло знижує рівні ErbB3 на поверхні клітин.

Антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом можуть бути досліджені на здатність пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3, наприклад пухлинних клітин, за допомогою відомих в цій галузі методів, таких як аналіз збудженої флуоресценції сортованих клітин, описаний в Прикладах далі (дивись також, наприклад, Macallan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1998) 20;95(2):708-13; Perez et al. (1995) Cancer Research 55, 392-398).

В іншому варіанті здійснення антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, відбираються за здатністю пригнічувати секрецію VEGF клітинами, що експресують ErbB3. Це можна здійснити за допомогою добре відомих аналізів, таких як аналіз з використанням набору VEGF ELISA від фірми R&D Systems (США, кат. №DY293B). Подібно до цього, антитіла чи їх частини можуть відбиратись за здатністю пригнічувати міграцію клітин, що експресують ErbB3 (наприклад, клітин MCF-7) з використанням транс-лункового аналізу (Millipore Corp., США, кат. № ECM552), як його тут описано.

В іншому варіанті здійснення даного винаходу антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, відбираються за здатністю пригнічувати сфероїдальний ріст клітин, що експресують ErbB3. Це можна здійснити за допомогою аналізу, який апроксимує умови розвитку пухлинного росту (дивись, наприклад, Herman et al. (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication), як тут описано.

Антитіла чи їх частини, що зв'язують антиген, можуть зв'язуватись з тим самим епітопом чи з епітопами, що накладаються, оскільки одне чи більше антитіл за цим винаходом можуть бути ідентифіковані також за допомогою стандартних методів, відомих в цій галузі і описаних тут. Наприклад, для того, щоб відібрати антитіла, які зв'язуються з тим самим епітопом чи з епітопом, що накладається, на ErbB3, зв'язаному досліджуванним антитілом, може бути використаний епітоп-перехресний конкурентний аналіз, такий як описаний в книзі Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow & David Lane (1988).

#### IV. Фармацевтичні композиції

В іншому аспекті даний винахід стосується композиції, наприклад фармацевтичної композиції, яка містить одне моноклональне антитіло чи комбінацію моноклональних антитіл або їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом, разом з фармацевтично прийнятним носієм. В одному варіанті здійснення такі композиції включають комбінацію з кількох (наприклад, двох чи більше) окремих антитіл за цим винаходом, які зв'язують різні епітопи на ErbB3.

Термін "фармацевтично прийнятний носій", як він тут використовується, включає будь-який і всі розчинники, середовища для диспергування, покриття, антибактеріальні і антифунгальні препарати, ізотонічні агенти, агенти, що уповільнюють всмоктування, і т.п., що є фізіологічно сумісними. Переважно, такий носій є придатним для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, парентерального, спинального чи епідермального введення (наприклад, у вигляді ін'єкції чи інфузії). В залежності від шляху введення, активна сполука, тобто антитіло, біспецифічна чи мультиспецифічна молекула, може бути покрита матеріалом, який захищає її від дії кислот та інших природних умов, здатних інактивувати цю сполуку.

"Фармацевтично прийнятна сіль" стосується солі, яка зберігає бажану біологічну активність материнської сполуки і не чинить будь-яких небажаних токсикологічних ефектів (дивись, наприклад, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Приклади таких солей включають солі, отримані шляхом додавання кислоти, і солі, отримані шляхом додавання основи. Солі приєднання кислоти включають ті, що походять від нетоксичних неорганічних кислот, таких як соляна, азотна, фосфорна, сірчана, бромисто-воднева, йодисто-воднева, фосфориста і т.п., а також від нетоксичних органічних кислот, таких як аліфатичні моно- і дикарбонові кислоти, феніл-заміщені алканові кислоти, гідроксиполіалканові кислоти, ароматичні кислоти, аліфатичні і ароматичні сильфонові кислоти і т.п. Солі приєднання основи включають ті, що походять від лужноземельних металів, таких як натрій, калій, магній, кальцій і т.п., а також від нетоксичних органічних амінів, таких як N, N'-добензилетилендіамін, N-метилглюкамін, хлорпрокаїн, холін, диетаноламін, етилендіамін, прокаїн і т.п.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть вводитись окремо чи в складі комплексної терапії, тобто в комбінації з іншими препаратами. Наприклад, така комплексна терапія може включати композицію за цим винаходом і щонайменше один чи більше додатковий терапевтичний препарат, такий як протиракові препарати, які будуть описані далі. Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть також вводитись у поєднанні з променевою терапією та/або хірургією.

Композиція за цим винаходом може вводитись різними способами, відомими в цій галузі. Як має бути зрозуміло спеціалістам, шлях та/або спосіб введення будуть залежати від бажаних результатів. Активні сполуки можуть бути доповнені носіями, які захищають їх від швидкого вивільнення, як це має місце в препаратах з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти, трансдермальні накладки і мікроінкапсульовані системи доставки. Для цього можуть використовуватись біосумісні полімери, що біологічно розкладаються, такі як етилен вінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри і полімолочна кислота (полімер молочної кислоти). Спеціалістам в цій галузі відомо багато методів приготування таких препаратів, в тому числі і запатентованих. Дивись, наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Щоб ввести сполуку за цим винаходом певними шляхами введення може знадобитись покрити цю сполуку матеріалом, що запобігає її інактивації, або вводити її одночасно з таким матеріалом. Наприклад, сполука може вводитись суб'єкту у відповідному носії, наприклад в ліпосомах чи в розріджувачі. Фармацевтично прийнятні розріджувачі включають сольові і водні буферні розчини. Ліпосоми включають емульсії вода-в-маслі-в-воді фірми CGF і звичайні ліпосоми (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини чи дисперсії і стерильні порошки для приготування для негайного прийому стерильних ін'єкційних розчинів чи дисперсій. Використання таких середовищ і агентів для фармацевтично активних субстанцій є добре відомим спеціалістам в цій галузі. Крім випадків, коли будь-яке звичайне середовище чи агент є несумісними з активною сполукою, використання їх в фармацевтичних композиціях за цим винаходом є можливим. В такі композиції можуть включатись також допоміжні активні сполуки.

Терапевтичні композиції типово мають бути стерильними і стабільними в умовах виготовлення і зберігання. Така композиція може мати вигляд розчину, мікроемульсії, ліпосоми чи іншої упорядкованої структури, придатної для того, щоб містити високу концентрацію препарату. Носій може бути розчинником чи середовищем для диспергування, яке містить, наприклад, воду, етиловий спирт, поліол (наприклад, гліцерин, пропилен гліколь і рідкий поліетилен гліколь і т.п.), а також їх придатні суміші. Необхідна текучість може підтримуватись, наприклад, за рахунок використання покриття, такого як лецитин, забезпечення необхідного розміру часток у випадку дисперсії і застосування сурфактантів. В багатьох випадках буває доцільно включати в композицію ізотонічні агенти, наприклад цукри, поліспирти, такі як манітол, сорбіт, чи натрію хлорид. Пролонговане всмоктування ін'єкційних композицій може забезпечуватись включенням до їх складу агента, який уповільнює всмоктування, наприклад моностеаратних солей чи желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини можуть готуватись включенням активної сполуки в необхідній кількості у відповідний розчинник з одним інгредієнтом чи з комбінацією інгредієнтів, перелічених вище, як необхідно, з наступною стерилізацією мікрофільтрацією. Загалом, дисперсії готують включенням активної сполуки в стерильний носій, який містить основне середовище для диспергування і інші необхідні інгредієнти з тих, що перелічені вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних ін'єкційних розчинів кращими методами приготування є вакуумна сушка і сушка заморожуванням (ліофілізація), які дають порошок активної сполуки плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з його попередньо стерилізованого фільтруванням розчину.

Схеми введення регулюються таким чином, щоб забезпечити оптимальну бажану реакцію (наприклад, терапевтичну реакцію). Наприклад, може вводитись єдиний болюс, можуть вводитись кілька розділених доз за певний час чи доза може пропорційно зменшуватись або збільшуватись, що визначається потребами конкретної терапевтичної ситуації. Наприклад, людські антитіла за цим винаходом можуть вводитись один раз чи двічі на тиждень шляхом підшкірної ін'єкції або раз чи два на місяць шляхом підшкірної ін'єкції.

Особливо доцільно мати парентеральні композиції у вигляді дозованої лікарської форми, що забезпечує легкість введення і однорідність дози. Дозована лікарська форма, як цей термін тут використовується, стосується фізично дискретних одиниць, призначених для введення за один раз суб'єктам, які лікуються; при цьому кожна одиниця містить наперед визначену кількість активної сполуки, розраховану так, щоб викликати бажаний терапевтичний ефект, у сполученні з необхідним фармацевтичним носієм. Технічні вимоги до дозованих лікарських форм за цим винаходом диктуються і безпосередньо залежать від (а) унікальних характеристик активної сполуки і того конкретного терапевтичного ефекту, який необхідно досягти, і (б) обмежень, які накладаються способом приготування такої активної сполуки з урахуванням чутливості індивідуумів.

Приклади фармацевтично прийнятних антиоксидантів включають: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїну гідрохлорид, натрію бісульфат, натрію метабісульфіт, натрію сульфат і т.п.; (2) антиоксиданти, розчинні в олії, такі як аскорбілпальмітат, бутильований оксианізол (ВНА), бутильований окситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгалат, альфа-токоферол і т.п.; і (3) металохелатні агенти, такі як лимонна кислота, етилендіамін тетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота і т.п.

Препарати, що містять терапевтичні композиції за цим винаходом, можуть бути призначеними для орального, назального, місцевого (включаючи трансбукальне і сублінгвальне), ректального, вагінального та/або парентерального введення. Для зручності ці препарати можуть бути у вигляді дозованої лікарської форми, і їх можна приготувати будь-якими методами, відомими в галузі фармації. Кількість активного інгредієнту, яка може комбінуватись з матеріалом-носієм для отримання дозованої лікарської форми, буде коливатись в залежності від суб'єкта, якого лікують, і конкретного способу введення. Кількість активного інгредієнту, яка може комбінуватись з матеріалом-носієм для отримання дозованої лікарської форми, загалом буде відповідати кількості композиції, яка викликає терапевтичний ефект. Загалом, від ста відсотків ця кількість буде в межах від приблизно 0,001 відсотка до приблизно 90 відсотків активного інгредієнта, краще від приблизно 0,005 відсотка до приблизно 70 відсотків, а найкраще від приблизно 0,01 відсотка до приблизно 30 відсотків.

Препарати за цим винаходом, призначені для вагінального введення, включають також песарії, тампони, креми, гелі, пасти, пінки чи аерозолі, які містять носії, визнані придатними для цієї галузі. Лікарські форми для місцевого чи трансдермального введення композицій за цим винаходом включають порошки, аерозолі, мазі, пасти, креми, лосьйони, гелі, розчини, накладки і лікарську форму для інгаляції. Активна сполука може змішуватись в стерильних умовах з фармацевтично прийнятним носієм, а також з будь-яким консервантом, буфером чи пропелентом, як може знадобитись.

Вирази "парентеральне введення" чи "введений парентерально", як вони тут використовуються, означають спосіб введення, інший ніж ентеральне і місцеве введення, звичайно у вигляді ін'єкції чи інфузії, і включає, без обмеження, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, інтраартеріальне, інтратекальне, інтракапсулярне, інтраорбітальне, інтракардіальне, інтрадермальне, інтраперитонеальне, транстрахеальне, підшкірне, субкутикулярне, інтраартикулярне, субкапсулярне, субарахноїдальне, інтраспинальне, епідуральне і інтратермальне введення.

Приклади придатних водних і неводних носіїв, які можуть бути використані в фармацевтичних композиціях за цим винаходом, включають воду, етиловий спирт, поліолі (такі як гліцерин, пропилен гліколь, поліетилен гліколь і т.п.) і їх суміші, рослинні олії, такі як оливкова

олія, і придатні для ін'єкції органічні складні ефіри, такі як етил олеат. Необхідна текучість може досягатись, наприклад, шляхом використання покриття, такого як лецитин, забезпеченням необхідного розміру часток у випадку дисперсій і застосуванням сурфактантів.

Такі композиції можуть містити також ад'юванти, такі як консерванти, зволожувачі, емульгатори і диспергатори. Конкретні приклади ад'ювантів, які є добре відомими спеціалістам в цій галузі, включають, наприклад, неорганічні ад'юванти (такі як солі алюмінію, наприклад фосфат алюмінію і гідроокис алюмінію), органічні ад'юванти (наприклад, сквален), ад'юванти на олійній основі, віросоми (наприклад, віросоми, які містять зв'язаний з мембраною гемаглютинін і нейрамінідазу, похідну від вірусу грипу).

Відсутність мікроорганізмів може забезпечуватись як описаними вище методами стерилізації, так і включенням різних антибактеріальних і антифунгальних препаратів, наприклад парабену, хлорбутанолу, фенолсорбінової кислоти і т.п. Може бути бажаним включення в такі композиції також ізотонічних агентів, таких як цукри, натрію хлорид і т.п. Крім того, пролонговане всмоктування ін'єкційної фармацевтичної форми може досягатись включенням агентів, які уповільнюють всмоктування, таких як моностеарат алюмінію і желатин.

Коли сполуки за цим винаходом вводяться як фармацевтичні препарати людям чи тваринам, вони можуть даватись окремо або як фармацевтична композиція, що містить, наприклад, від 0,001 до 90 % (краще від 0,05 до 70 %, так як від 0,01 до 30 %) активного інгредієнта в комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Незалежно від обраного шляху введення, сполукам за цим винаходом, які можуть використовуватись і відповідній гідратованій формі, та/або фармацевтичним композиціям за цим винаходом фармацевтично прийнятні лікарські форми можуть надаватись звичайними методами, відомими спеціалістам в цій галузі.

Дійсний рівень дози активного інгредієнту в фармацевтичній композиції може змінюватись з метою досягнення такої кількості активного інгредієнту, яка є ефективною для забезпечення бажаної терапевтичної реакції для даного пацієнта, складу препарату і способу введення і не буде токсичною для цього пацієнта. Обраний рівень дози буде залежати від широкого кола фармакокінетичних чинників, включаючи активність тих конкретних композицій за цим винаходом, які використовуються, форми активного інгредієнту (складний ефір, сіль чи амід), шляху введення, тривалості введення, швидкості екскреції даної сполуки, тривалості лікування, інших препаратів, сполук та/або матеріалів, які використовуються одночасно, віку, статі, маси тіла, хвороби, загального стану здоров'я, анамнезу пацієнта і подібних чинників добре відомих медикам. Лікар чи ветеринар, які мають звичайну підготовку, можуть легко визначити і призначити ефективну кількість необхідної фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар чи ветеринар можуть почати вводити сполуки за цим винаходом у фармацевтичній композиції з рівня, нижчого ніж той, який необхідний для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, і поступово підвищувати дозу доки не буде досягнутий бажаний ефект. Загалом, доцільною добовою дозою композиції за цим винаходом буде така кількість сполуки, яка є найнижчою ефективною дозою, здатною забезпечити терапевтичний ефект. Така ефективна доза буде загалом залежати від описаних вище чинників. Краще, щоб введення було внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, інтраперитонеальним чи підшкірним, причому краще вводити близько до місця-мішені. Якщо це бажано, ефективна добова доза терапевтичної композиції може вводиться за два, три, чотири, п'ять, шість чи більше прийомів через відповідні інтервали впродовж одного дня, факультативно у вигляді дозованих лікарських форм. Хоча можливо, щоб сполука за цим винаходом вводилась окремо, доцільно вводити цю сполуку у вигляді фармацевтичного препарату (композиції).

Терапевтичні композиції можуть вводиться за допомогою медичних пристроїв, відомих в цій галузі. Наприклад, в кращому варіанті здійснення терапевтична композиція за цим винаходом може вводиться за допомогою безголкового підшкірного ін'єкційного пристрою, описаного в патентах США №№ 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 чи 4,596,556. Приклади добре відомих імплантатів і модулів, які можуть бути використані за цим винаходом, включають ті, що описані в патенті США № 4,487,603 (мікро-інфузійний насос, що імплантується, для видачі медикаменту з контрольованою швидкістю), в патенті США № 4,486,194 (терапевтичний пристрій для введення медикаментів через шкіру), в патенті США № 4,447,233 (інфузійний насос для видачі медикаменту, який забезпечує точну швидкість вливання), в патенті США № 4,447,224 (інфузійний апарат, що імплантується, для постійної доставки препарату з регульованою швидкістю), в патенті США № 4,439,196 (багатокамерна осмотична система доставки препарату) і в патенті США № 4,475,196 (осмотична система доставки препарату). Спеціалістам в цій галузі відомо багато інших імплантатів, систем доставки і модулів.

В певних варіантах здійснення моноклональні антитіла за цим винаходом можуть входити в рецептуру, яка забезпечує належний їх розподіл *in vivo*. Наприклад, бар'єр кров-головний мозок виключає застосування багатьох сполук з сильною гідрофільністю. Щоб сполуки за цим винаходом могли перетинати цей бар'єр (якщо це бажано), вони можуть вводитись у вигляді, наприклад, ліпосом. Способи виготовлення ліпосом описані, наприклад, в патентах США №№ 4,522,811; 5,374,548; і 5,399,331. Ліпосоми можуть включати одну чи більше складових, які вибірково транспортуються до специфічних клітин чи органів, тим самим посилюючи цільову доставку препаратів (дивись, наприклад, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Показові спрямовуючі складові ліпосом включають фолат чи біотин (дивись, наприклад, патент США № 5,416,016, виданий Low et al.); манозиди (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитіла (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); рецептор протеїну А сурфактанту (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134). Вони можуть включати препарати за цим винаходом, а також компоненти винайдених молекул (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); дивись також K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### V. Методи використання антитіл за даним винаходом

Даний винахід стосується також методів використання антитіл і їх частин, що зв'язують ErbB3, в різноманітних діагностичних і терапевтичних застосуваннях *ex vivo* і *in vivo*. Наприклад, антитіла за цим винаходом можуть бути використані для лікування хвороби, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів, включаючи різновиди раку.

В одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу лікування хвороби, що асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів, шляхом введення суб'єкту антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за цим винаходом в кількості, яка є ефективною в лікуванні цієї хвороби. Відповідні хвороби включають, наприклад, різновиди раку, включаючи, але не обмежуючись ними, меланому, рак молочної залози, рак яєчника, світлоклітинну карциному, рак шлунково-кишкового тракту, рак ободової кишки, рак легень і рак передміхурової залози.

Таке антитіло може вводиться окремо чи разом з іншим терапевтичним препаратом, який діє спільно чи в синергизмі з цим антитілом в лікуванні хвороби, що асоціюється з опосередкованим ErbB3 проведенням сигналів. Такі терапевтичні препарати включають, наприклад, протиракові препарати, описані далі (наприклад, цитотоксини, хіміотерапевтичні препарати, низькомолекулярні препарати і опромінення).

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу діагностики хвороби (наприклад, раку), що асоціюється з підвищеною регуляцією ErbB3 у суб'єкта, шляхом контактування антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, за цим винаходом (наприклад, *ex vivo* чи *in vivo*) з клітинами від цього суб'єкта і визначення рівня зв'язування з ErbB3 на цих клітинах. Аномально високі рівні зв'язування з ErbB3 засвідчують, що даний суб'єкт має хворобу, що асоціюється з підвищеною регуляцією ErbB3.

В об'єм даного винаходу входять також набори, які містять антитіла і їх частини, що зв'язують антиген, за цим винаходом і, факультативно, інструкцію щодо їх використання в лікуванні хвороби, що асоціюється з підвищеною регуляцією ErbB3 та/або залежного від ErbB3 проведення сигналів. Такі набори можуть включати етикетку, інформація на якій стосується призначення вмісту набору. Термін "етикетка" включає будь-який напис, маркетингові матеріали чи матеріал, записаний на плівку, який розміщується зверху чи всередині набору або супроводжує набір якимось іншим способом.

Інші варіанти здійснення даного винаходу описані в наступних Прикладах.

Даний винахід ілюструється також наступними Прикладами, які не мають вважатись такими, що обмежують його об'єм. Зміст Переліку послідовностей, малюнків і всіх посилань, патентів і опублікованих патентних заявок вважаються включеними в цей опис в повному об'ємі за посиланням.

#### Приклади

##### Матеріали і методи

В цих прикладах були використані наступні матеріали і методи, якщо не вказувалось на інше.

Загалом, практика здійснення даного винаходу передбачає використання, якщо не вказується на інше, звичайних методів хімії, молекулярної біології, біотехнології на основі рекомбінантної ДНК, імунології (зокрема, наприклад, технології отримання антитіл) і стандартних методик приготування поліпептидів. Дивись, наприклад, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A

Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); i Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Модельні системи in vitro i in vivo для аналізу біології HCV (вірусу гепатиту C) описані, наприклад, в Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C, Lab. Anim. (NY);34(2):39-47 (2005), а також в The chimpanzee model of hepatitis C virus infections, ILAR J.;42(2):117-26 (2001).

Клітинні лінії

Всі клітинні лінії, які були використані в описаних далі експериментах, було отримано від Національного інституту раку (США) чи надано дослідниками (дивись відповідні посилання).

Клітинні лінії:

MCF7-ATCC кат. № HTB-22

T47D-ATCC кат. № HTB-133

Colo357 – Ці клітини було отримано від одного з дослідників, наукового співробітника університету; вони описані Kolb et al. (2006) Int. J. Cancer, 120:514-523.

Du145-ATCC кат. № HTB-81

OVCAR8 – джерело вже описувалось в попередній заявці.

H1975 ATCC кат. № CRL-5908

Подрібнення пухлинних клітин на порошок

Для подрібнення пухлин на порошок було використано кріопульверизатор (Covaris Inc).

Пухлини зберігались в спеціальних мішечках (що попередньо зважувались), які до використання знаходились в рідкому азоті. В разі дрібних пухлин спочатку в мішечок з пухлиною вводили 200 мкл буферу для лізису, заморожували в рідкому азоті, а потім перетворювали на порошок, щоб покращити вихід пухлини з мішечка. Подрібнені на порошок пухлини переносили в 2-мл пробірки Епендорфа, які зберігались в рідкому азоті до готовності до наступної обробки.

Лізис пухлинних клітин

Лізис пухлин здійснювався в буфері для лізису, доповненому інгібіторами протеази і фосфатази. Лізис для буферу додавався аліквотами до кінцевої концентрації приблизно 62,5 мг/мл. Зразки пухлини гомогенізували інтенсивним перемішуванням на вортексі впродовж 30 сек і інкубацією на льоду впродовж приблизно 30 хвилин. Лізати прокручували приблизно 10 хвилин в колонках Qiagen QiaShredder для подальшої гомогенізації зразків. Очищені лізати переносили аліквотами в свіжі пробірки для подальшої обробки.

Кількісний аналіз на вміст білків (аналіз BCA)

Аналіз BCA (Pierce) здійснювався у відповідності до протоколу виробника на всіх зразках пухлин. Загальна концентрація білку (в мг/мл) в кожному зразку пухлини пізніше використовувалась для нормалізації результатів ELISA.

Аналіз ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз)

Всі реактиви для загального і фосфо-ErbB3 аналізів ELISA були придбані у фірми R&D Systems у вигляді наборів Duoset. 96-лункові планшети Nunc Maxisorb покрили 50 мкл антитіла і інкубували впродовж ночі при кімнатній температурі. Наступного ранку планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Потім планшети блокували біля 1 години при кімнатній температурі, використовуючи 2 % альбумін бичачої сироватки (BSA) у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS). Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). 50 мкл клітинних лізатів і стандартів розвели в 50 % буфері для лізису і використали 1 % альбумін бичачої сироватки (BSA) в двох повтореннях для подальшої обробки. Зразки інкубували впродовж 2 годин при 4°C на планшетному шейкері і тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Приблизно 50 мкл детекторного антитіла розвели в 2 % BSA, додали PBST і інкубували приблизно 1 годину при кімнатній температурі. Для фосфо-ErbB3 детекторне антитіло кон'югували безпосередньо до пероксидази хрому (HRP) і інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Додали приблизно 50 мкл Streptavidin-HRP і інкубували 30 хвилин при кімнатній температурі (крім pErbB3). Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Додали приблизно 50 мкл субстрату Supersignal Pico ELISA і піддали планшету зчитуванню, використовуючи зчитувач планшет Fusion. Отримані дані аналізувались за допомогою EXCEL. Зразки-дублікати усереднювали, і планки погіршностей використовували для репрезентації стандартного відхилення між двома повтореннями.

Приклад 1: Отримання антитіл за допомогою фагового дисплею

Для того, щоб отримати анти-ErbB3 антитіла людини, які тут називаються Ab №6, Ab №3, Ab №14, Ab №17, і Ab №19, Fab-фагову бібліотеку людини, яка включає унікальну комбінацію імуноглобулінових послідовностей від донорів-людей (Hoet et al. *supra*, включено в повному об'ємі в цей опис за посиланням), було спочатку піддано скринінгу щодо зв'язувальних

5

компонентів ErbB3. При використанні очищеного ErbB3 і клітинної лінії яєчника китайського хом'яка, що експресує ErbB3 на поверхні клітин, з цієї бібліотеки було ідентифіковано 73 унікальні Fab послідовності. Ці 73 клони було переформатовано як тільки Fab без фага. За допомогою методів з високим виходом ці Fab були виділені в невеликій кількості і випробувані на зв'язування з використанням аналізу ELISA і методу Flexchip, що є високоефективною технологією поверхневого плазмонного резонансу (SPR). Всі 73 Fab без фага були нанесені на поверхню чіпу для визначення кінетики зв'язування і блокування епітопу до злитого цільового білку ErbB3-his чи ErbB3-Fcprotein (R & D Systems). З отриманих даних було вираховано константу рівноважного зв'язування і швидкості "включення-виключення".

10

Потім оцінювалось зв'язування різних Fab з клітинами MALME-3М, для чого використовували приблизно 500 нМ Fab і розведення 1:750 вторинного антитіла козла проти людини Alexa 647. Як показано на Фіг. 1А і 1В, кілька Fab-кандидатів демонстрували помітне забарвлення на клітинах MALME-3М.

15

Приклад 2: Оптимізація анти-ErbB3 Fab

20

Після ідентифікації Fab, які блокували зв'язування ErbB3 ліганду херегуліну до ErbB3, послідовності VH і VL Fab були оптимізовані щодо кодону наступним чином.

Конкретно, ділянки VH і VL були переформатовані з використанням конструкцій для експресії ізо типу IgG1 чи IgG2. Ці конструкції експресії включали каркас Selexis, який має касету, призначену для заміщення відповідних послідовностей важкого і легкого ланцюгів. Вектори Selexis включали ЦМВ промотор і узгоджуючий полі-А сигнал.

25

Послідовності нуклеїнових кислот для кодон-оптимізованих VH і VL антитіла Ab №6 наведені в SEQ ID №: 25 і 26, відповідно, а послідовності нуклеїнових кислот для антитіла Ab №3 – в SEQ ID №: 27 і 28, відповідно, як показано на Фіг. 22.

Приклад 3: Афіністність зв'язування для ErbB3

30

Константи дисоціації анти-ErbB3 антитіл були визначені за допомогою двох незалежних методів, а саме аналізу поверхневого плазмонного резонансу і аналізу зв'язування клітин, з використанням клітин MALME-3М.

Аналіз поверхневого плазмонного резонансу

35

Аналіз поверхневого плазмонного резонансу (який називають також аналізом Flexchip) здійснювався так, як описано в Wassaf et al. (2006) *Analytical Biochem.*, 351:241-253. Значення  $K_D$  вираховували, виходячи з формули  $K_D = K_d / K_a$ .

Значення  $K_D$  для антитіл Ab №6 і Ab №3, відповідно, визначені за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу, наведені на Фіг. 2А і 2В. Антитіло Ab №6 мало величину  $K_D$  біля 4 нМ, а антитіло Ab №3 мало величину  $K_D$  біля 8 нМ, як показано на Фіг. 2А і 2В, відповідно.

40

Аналіз зв'язування клітин

Аналіз зв'язування клітин для визначення значень  $K_D$  для антитіл Ab №6 і Ab №3 здійснювався наступним чином.

Клітини MALME-3М були відщеплені за допомогою 2 мл трипсину-EDTA (етилендіамін тетраоцтова кислота) + 2 мл RPMI (живильне середовище, яке використовується в імунобіологічній діагностиці) + 5 мМ EDTA при кімнатній температурі впродовж 5 хвилин. Повне середовище RPMI (10 мл) додали відразу до оброблених трипсином клітин, обережно ресуспендували і розігнали в настільній центрифугі Beckman при 1100 об/хв. впродовж 5 хвилин. Клітини ресуспендували в буфері барвника BD (PBS+2 % фетальна бичача сироватка + 0,1 % натрію азид, Becton Dickinson) при концентрації  $2 \times 10^6$  клітин на мл, і 50-мкл ( $1 \times 10^5$  клітин) аліквоти переносили на 96-лункову титрувальну планшету.

45

В пробірці Епендорфа приготували 150 мкл розчину 200 нМ анти-ErbB3 антитіла (Ab №6 і Ab №3) в буфері барвника BD і серійно розвели 2-кратно в 75 мкл буферу барвника BD. Концентрації такого розведеного антитіла були в межах від 200 нМ до 0,4 нМ. Потім 50-мкл аліквоти різних розведень білку додали безпосередньо до 50 мкл клітинної суспензії, отримавши кінцеві концентрації антитіла 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12 нМ, 6 нМ, 3 нМ, 1,5 нМ, 0,8 нМ, 0,4 нМ і 0,2 нМ.

55

Порції клітин в 96-лунковій планшеті інкубували з розведеннями білку впродовж 30 хвилин при кімнатній температурі на платформному шейкері і промили тричі, використовуючи 300 мкл буферу барвника BD. Клітини потім інкубували з 100 мкл розведення 1:750 міченого IgG козла

60



проти людини Alexa 647 в буфері барвника BD впродовж 45 хвилин на платформному шейкері в холодному приміщенні. Насамкінець, клітини двічі промили, осадили центрифугуванням і ресуспендували в 250 мкл буферу барвника BD+0.5 мкг/мл пропідіуму йодиду. Аналіз 10000 клітин було здійснено на проточному цитометрі FACScalibur з використанням каналу FL4.

Величини MFI (середньократний приріст) і відповідні концентрації анти-ErbB3 антитіла наносились, відповідно, на у-вісь і х-вісь. Значення  $K_D$  молекули визначали за допомогою GraphPad Prism з використанням моделі зв'язування на одному сайті для побудови кривої нелінійної регресії.

Значення  $K_D$  було вираховано за формулою  $Y = B_{max} \cdot X / (K_D + X)$  ( $B_{max}$  = флуоресценція при насиченні;  $X$  = концентрація антитіла;  $Y$  = ступінь зв'язування). Як показано на Фіг. 2C і 2D, антитіла Ab №6 і Ab №3 мали  $K_D$  приблизно 4 нМ і 1,3 нМ, відповідно, за даними аналізу зв'язування клітин з використанням клітин MALME-3M.

Приклад 4: Специфічність зв'язування / зв'язування з епітопом для ErbB3

Специфічність зв'язування ізотипу IgG2 антитіла Ab №6 з ErbB3 оцінювалась за допомогою аналізу ELISA наступним чином. Аналізувалась також ідентифікація епітопу, зв'язаного антитілом Ab №6.

Більш конкретно, 96-лункові планшети Nunc Maxisorb покрили 50 мкл 5-мкг/мл білку (рекомбінантний ErbB3 людини, рекомбінантний EGFR людини чи неспоріднений білок (BSA)) і інкубували впродовж ночі при кімнатній температурі. Наступного ранку тричі промили планшети, використовуючи 1000 мкл/лунку PBST (0,05 % Твін-20) в засобі BioTek для мийки планшет. Потім лунки блокували впродовж 1 години при кімнатній температурі з 2 % BSA в PBS. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку PBST (0,05 % Твін-20) в засобі BioTek для мийки планшет. Додали приблизно 50 мкл антитіла Ab №6 в кількох розведеннях (1 мкл і серійні 2-кратні розведення) в 2 % BSA, PBST. Всі зразки проганяли двічі і інкубували впродовж 2 годин при 4°C на шейкері для планшет. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку PBST (0,05 % Твін-20) в засобі BioTek для мийки планшет. Додали 50 мкл детекторного антитіла IgG людини (кон'югованого до HRP (Bethyl Inc; розведення 1:75000 в 2 % BSA, PBST)) і інкубували планшети впродовж 1 години при кімнатній температурі. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку PBST (0,05 % Твін-20) в засобі BioTek для мийки планшет. Додали 50 мкл субстрату Supersignal Pico ELISA і піддали планшети зчитуванню на зчитувачі планшет Fusion. Отримані дані були проаналізовані з використанням програми EXCEL. Дані для дублікатних зразків усереднили і представили стандартне відхилення у вигляді планок похибки між двома повтореннями.

Як показано на Фіг. 3, антитіло Ab №6 зв'язувало рекомбінантний ErbB3 в аналізі ELISA, Але не демонструвало скільки-небудь помітного зв'язування з EGFR, BSA чи TGF- $\alpha$ .

Фрагмент (мутант відсічення), який відповідає амінокислотним залишкам 20-202 ErbB3, було клоновано в дисплейний вектор дріжджів rYD2 (модифікована версія rYD1 (Invitrogen) зі стоп-кодоном, пристроєним попереду мітки Gica) між рестрикційними сайтами Nhe і BsiWI. Цю плазмиду було трансформовано в штам дріжджів EBY100 (Invitrogen) і клони, що містили цю плазмиду після селекції на Trp-селективному середовищі. Такий клон вирощували у середовищі, що містить глюкозу, впродовж ночі при 30°C, і експресію мутанту усічення ErbB3 індукували перенесенням у середовище, що містить галактозу, на 2 доби при 18°C. Дріжджі, які демонстрували мутант усічення ErbB3, фарбували, використовуючи 50 нМ антитіла Ab №6, а потім антитілом козла проти людини, міченим барвником Alexa-647. Окремий зразок фарбували тільки антитілом козла проти людини, щоб показати відсутність неспецифічного зв'язування цього вторинного антитіла до дріжджів. Аналіз здійснювався за допомогою проточної цитометрії на сортувальнику клітин FACS Calibur (BD Biosciences).

Як показано на Фіг. 30, антитіло Ab №6 зв'язувалось з мутантом усічення, тобто з амінокислотними залишками 20-202 ErbB3.

Приклад 5: Знижена регуляція загального ErbB3 на пухлинних клітинах

Здатність антитіла Ab №6 знижувати експресію ErbB3 in vitro і in vivo в пухлинних клітинах досліджувалась наступним чином.

Клітини MALME-3M засівали на 96-лункові планшети для тканинної культури і вирощували в середовищі RPMI-1640, доповненому антибіотиками, 2 mM L-глутаміну і 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS), впродовж 24 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю. Середовище потім змінили на RPMI-1640 MEDIA з антибіотиками, 2 mM L-глутаміну з антитілом чи без нього в концентраціях 1 мкМ, 250 нМ, 63 нМ, 16 нМ, 4,0 нМ, 1,0 нМ, 240 пМ, 61 пМ і 15 пМ. Клітини вирощували впродовж 24 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю, після чого промили холодним PBS, потім збирали за допомогою буферу для лізису з білковим екстрактом ссавця (MPER) (Pierce, 78505), який містив 150 mM NaCl, 5 mM натрію пірофосфату, 10 мкМ bpV (phen), 50 мкМ

феналарсину, 1 мМ натрію ортованадату і коктейль інгібіторів протеази (Sigma, P714). Клітинні лізати розвели 2-кратно 4 % альбуміном бичачої сироватки у забуференому фосфатом сольовому розчині з 0,1 % Твін-20, після чого піддали аналізу ELISA з іммобілізованим антитілом ErbB3 миші проти людини і біотинильованим вторинним детекторним антитілом ErbB3 миші проти людини. Сигнал генерували стрептавідином, кон'югованим до пероксидази хрому, яка прореагувала з хемілюмінесцентним субстратом (Pierce, 37070). Результати ELISA візуалізувались за допомогою люменометру.

Як показано на Фіг. 4, антитіло Ab №6 знизило загальні рівні ErbB3 на 46,9 % в клітинах MALME-3M *in vitro*, як було визначено за допомогою аналізу ELISA. Середовище, що не містило сироватки і антитіла, слугувало в якості контролю.

В подальшому експерименті знижена регуляція рецепторів ErbB3 на клітинах MALME-3M досліджувалась за допомогою аналізу FACS з використанням ізотипів IgG1 і IgG2 антитіла Ab №6. Клітини MALME-3M піддали трипсинізації з 15-см чашки і промили один раз середовищем RPMI+10 % фетальної бичачої сироватки. Отримані після центрифугування клітини ресуспендували при щільності  $1 \times 10^6$  клітин на мл. Дві аліквоти по  $2 \times 10^5$  клітин додали до 12-лункової планшети для тканинної культури і ресуспендували в кінцевому об'ємі 800 мкл середовища RPMI+10 % фетальної бичачої сироватки. До однієї лунки додали ізотип IgG1 чи IgG2 антитіла Ab №6 до кінцевої концентрації 100 нМ (оброблений зразок), а в другу лунку – еквівалентний об'єм PBS (необроблений зразок).

Наступного дня оброблені і необроблені клітини були піддані трипсинізації, промиті, після чого їх інкубували з 100 нМ антитіла Ab №6 в буфері з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Потім клітини двічі промили, використовуючи 1 мл буферу з барвником BD, і інкубували зі 100 мкл розведення 1:500 міченого Alexa-647антитілом козла проти людини впродовж 45 хвилин на льоду. Після цього клітини промили і ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD+0,5 мкг/мл пропідіуму йодиду. Аналіз 10000 клітин було здійснено в проточному цитометрі FACScalibur з використанням каналу FL4.

Як показано на Фіг. 5A і 5B, обидва ізотипи IgG1 і IgG2 антитіла Ab №6 знижували активність ErbB3 на клітинах MALME-3M приблизно на 62 % і 66 %, відповідно.

Для того, щоб встановити чи обумовлене це зниження інтерналізацією рецептору ErbB3 на поверхні клітин MALME-3M, визначили експресію ErbB3 в присутності антитіла впродовж певного часу. Більш конкретно, клітини MALME-3M трипсинізували з 15-см чашки і промили 1 раз середовищем RPMI+10 % фетальної бичачої сироватки. Отримані після центрифугування клітини ресуспендували при щільності  $1 \times 10^6$  клітин на мл. Дві аліквоти по  $2 \times 10^5$  клітин додали до 12-лункової планшети для тканинної культури і ресуспендували в кінцевому об'ємі 800 мкл середовища RPMI+10 % фетальної бичачої сироватки. До однієї лунки додали анти-ErbB3 антитіло до кінцевої концентрації 100 нМ (оброблений зразок), а до другої лунки – еквівалентний об'єм PBS (необроблений зразок). Наступного дня оброблені і необроблені клітини були піддані трипсинізації, промиті, після чого їх інкубували з 100 нМ антитіла Ab №6 в буфері з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Потім клітини двічі промили, використовуючи 1 мл буферу з барвником BD, і інкубували зі 100 мкл розведення 1:500 міченого Alexa-647антитілом козла проти людини впродовж 45 хвилин на льоду. Після цього клітини промили і ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD+0,5 мкг/мл пропідіуму йодиду. Аналіз 10000 клітин було здійснено в проточному цитометрі FACScalibur з використанням каналу FL4.

Як показано на Фіг. 6, знижена регуляція ErbB3 в присутності антитіла Ab №6 визначалась в 0 годин (Фіг. 6A), через 0,5 години (Фіг. 6B), через 2 години (Фіг. 6C) і через 24 години (Фіг. 6D). Як показано на 6A-6D, кількість рецепторів ErbB3 на поверхні клітин була зниженою приблизно на 50 % через 30 хвилин і приблизно на 93 % через 24 години.

Здатність антитіла Ab №6 викликати зменшувати кількість рецепторів ErbB3 була досліджена також *in vivo* в клітинах меланоми.

Коротенько, це здійснювалось наступним чином. Миші nu/nu з дефіцитом Т-клітин (самки мишей 3-4-тижневого віку з Національного інституту здоров'я (США); аутбредні; альбіносного фенотипу) були придбані у фірми Charles River Labs (США). Клітини MALME-3M для імплантації були вирощені в культурі (середовище RPMI, 10 % FBS, L-глутамін і антибіотики, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) до приблизно 80 % конфлюентності перед збиранням. Клітини тримали на льоду до імплантації. Мишей імплантували підшкірною ін'єкцією 100 мкл клітин MALME-3M у правий бік і давали їм відновитись при забезпеченні контролю за початковим пухлинним ростом.

Пухлини вимірювались (довжина на ширину) за допомогою цифрового штангенциркулю; мишам вводили IgG2a (Sigma, M7769-5MG) у вигляді внутрішньовенної ін'єкції. Потім їм щодня

вводили інтраперитонеально 15 мкг чи 100 мкг антитіла №6; пухлини вимірювали тричі на тиждень, заносючи результати в електронну таблицю Microsoft EXCEL.

Після останнього виміру пухлин (L x W) мишей піддавали евтаназії шляхом асфіксії CO<sub>2</sub> і пухлини висікали, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C (для біохімічного аналізу). Останні виміри пухлин аналізували і будували графіки площі пухлини і об'єму пухлини, як описано, наприклад, в Burtrum et al., (2003) Cancer Res., 63:8912-8921. Отримані дані аналізувались також "нормалізованими" і "ненормалізованими" засобами стосовно площі пухлини і об'єму пухлини. Для "нормалізації" даних в кожний інтервал вимірювання виміри кожної пухлини в кожній групі ділили на початковий розмір пухлини, визначений штангенциркулем.

Як показано на Фіг. 7, серед інших досліджених за допомогою цього аналізу антитіл, антитіло Ab №6 (обидва ізоформи IgG1 і IgG2) викликало зменшення загальної кількості ErbB3 в пухлинах вже через 24 години після ін'єкції. PBS використовувався в якості контролю.

В наступному експерименті досліджувалась здатність антитіла Ab №6 регулювати на пониження ErbB3 в ксенотрансплантатах ADRr in vivo.

Коротенько, зразки подрібнювались до порошкоподібного стану за допомогою кріопульверизатору (Covaris Inc). Пухлини зберігались в спеціальних мішечках (вони попередньо зважувались), які до використання знаходились в рідкому азоті. В разі дрібних пухлин в мішечок з пухлиною спочатку вводили 200 мкл буферу для лізису, заморожували в рідкому азоті, а потім перетворювали на порошок, щоб покращити вихід пухлини з мішечка. Подрібнені на порошок пухлини переносили в 2-мл пробірки Епендорфа, які зберігались в рідкому азоті до лізису. Лізис пухлин здійснювався в буфері для лізису, доповненому інгібіторами протеази і фосфатази. Лізис для буферу додавався аліквотами до кінцевої концентрації приблизно 62,5 мг/мл. Зразки пухлини гомогенізували інтенсивним перемішуванням на вортексі впродовж 30 сек і давали їм осісти на льоду впродовж приблизно 30 хвилин. Лізати прокручували приблизно 10 хвилин в колонках Qiagen QiaShredder для подальшої гомогенізації зразків. Очищені лізати переносили аліквотами в свіжі пробірки.

Кількісний аналіз на вміст білків (аналіз BCA) здійснювався, як було описано в розділі "Матеріали і методи" раніше.

Загальні рівні ErbB3 визначались за допомогою аналізу ELISA. Реактиви для аналізу ELISA були придбані у фірми R&D Systems у вигляді наборів DuoSet. 96-лункові планшети Nunc Maxisorb покрили 50 мкл іммобілізованого антитіла і інкубували впродовж ночі при кімнатній температурі. Наступного ранку планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Потім планшети блокували біля 1 години при кімнатній температурі, використовуючи 2 % альбумін бичачої сироватки (BSA) у забуференому фосфатном сольовому розчині (PBS). Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). 50 мкл клітинних лізатів і стандартів розвели в 50 % буфері для лізису і для подальшої обробки використали 1 % альбумін бичачої сироватки (BSA) в двох повтореннях. Зразки інкубували впродовж 2 годин при 4°C на планшетному шейкері і тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Приблизно 50 мкл детекторного антитіла розвели в 2 % BSA, додали PBST і інкубували приблизно 1 годину при кімнатній температурі. Для фосфо-ErbB3 детекторне антитіло кон'югували безпосередньо до пероксидази хрому (HRP) і інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Додали приблизно 50 мкл Streptavidin-HRP і інкубували 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети тричі промили, використовуючи 1000 мкл/лунку засобу BioTek для мийки планшет з PBST (0,05 % Твін-20). Додали приблизно 50 мкл субстрату Supersignal Pico ELISA і піддали планшети зчитуванню, використовуючи зчитувач планшет Fusion. Отримані дані аналізувались за допомогою EXCEL. Зразки-дублікати усереднювали, і планки погрішностей використовували для репрезентації стандартного відхилення між двома повтореннями.

Результати цього експерименту представлені на Фіг. 8. Як показано на Фіг. 8, антитіло Ab №6 викликало регулювання на пониження ErbB3 в ксенотрансплантатах ADRr in vivo.

Приклад 6: Пригнічення проліферації пухлинних клітин

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати проліферацію клітин, що експресують ErbB3 (наприклад, ракових клітин), досліджувалась наступним чином.

Клітини MALME3M, ACHN і NCI/ADRr висівались в 96-лункові планшети для тканинних культур і росли в середовищі RPMI-1640, доповненому антибіотиками, 2 мМ L-глутаміну і 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS), впродовж 24 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю. Це середовище потім замінили на середовище RPMI-1640 з антибіотиками, 2 мМ L-глутаміну і без

антибіотику чи з антибіотиком в концентрації 1 мкМ, 250 нМ, 63 нМ, 16 нМ, 4,0 нМ, 1,0 нМ, 240 нМ, 61 нМ і 15 нМ. Клітини вирощували впродовж 96 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю, після чого зібрали за методикою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7573) та проаналізували за допомогою люменометру. Середовище, яке не містило ні сироватки, ні антитіла, слугувало контролем.

Як показано на Фіг. 9, 10 і 11, антитіло Ab №6 пригнічувало проліферацію клітин MALME-3M (Фіг. 9), клітин раку яєчника ADRr (Фіг. 10) і клітин ACHN (Фіг. 11), які експресують ErbB3. Більш конкретно, антитіло Ab №6 пригнічувало проліферацію клітин MALME-3M приблизно на 19,6 %, як було визначено за допомогою проби на титроване світіння клітин, а проліферацію клітин раку яєчника ADRr приблизно на 30,5 %. Крім того, як показано на Фіг. 11, антитіло Ab №6 пригнічувало проліферацію клітин ACHN приблизно на 25,4 %.

Приклад 7: Пригнічення фосфорилляції ErbB3 в пухлинних клітинах

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати фосфорилляцію ErbB3 *in vivo* досліджувалась наступним чином.

Зразки подрібнювали до порошкоподібного стану за методикою, описаною в Прикладі 5 вище (Фіг. 8). Кількісний аналіз на вміст білків (аналіз BCA) здійснювався, як було описано в розділі "Матеріали і методи" раніше, а аналіз ELISA було виконано так, як описано в Прикладі 5 вище (Фіг. 8).

Результати цього експерименту наведені на Фіг. 12. Як показано на Фіг. 12, антитіло Ab №6 достовірно пригнічувало фосфорилляцію ксенотрансплантатів яєчника ADRr *in vivo*, що було визначено за кількістю фосфорильованого ErbB3 (pErbB3) в нг/мг загального білку.

Досліджувалась також здатність антитіла Ab №6 пригнічувати індуковану бетацелуліном (BTC) чи херегуліном (HRG) фосфорилляцію ErbB3. Це було здійснено наступним чином.

Клітини яєчника ADRr попередньо інкубували з антитілом Ab №6 впродовж 30 хвилин перед стимуляцією з використанням 50 мМ BTC, 10 мМ HRG чи 333 нМ TGF- $\alpha$ . Після попередньої інкубації середовище видалили і стимулювали клітини впродовж 5 хвилин при 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, використовуючи 50 нМ BTC чи 333 нМ (для PE498). Використовувався також HRG контроль (5 хвилин, 5 мМ), 10 % сироватки і контроль з 0 % сироватки. Клітини промили один раз холодним PBS і піддали лізису в 30 мкл холодного буферу для лізису (буфер M-PER плюс натрію ванадат (NaVO<sub>4</sub>, Sigma), 2-гліцерофосфат, феніларсин оксид, BrV і інгібітори протеази) з інкубацією на льоду впродовж 30 хвилин. Лізати зберігались впродовж ночі при -80°C.

Як показано на Фіг. 13A-13C, антитіло Ab №6 достовірно пригнічувало опосередковану бетацелуліном і херегуліном фосфорилляцію ErbB3.

В наступному експерименті досліджувалась здатність антитіла Ab №6 пригнічувати фосфорилляцію ErbB3 в клітинних лініях пухлини яєчника OVCAR 5 і OVCAR 8. Це було здійснено наступним чином.

Клітинні лінії OVCAR 5 і OVCAR 8 були отримані від Національного інституту раку (США), відділення лікування і діагностики раку ("DCTD"). Аналіз ELISA виконувався так, як описано в розділі "Матеріали і методи" вище.

Результати цього експерименту представлені на Фіг. 14A і 14B. Як показано на Фіг. 14A і 14B, антитіло Ab №6 пригнічувало фосфорилляцію ErbB3 в обох лініях клітин раку яєчника – OVCAR 5 і OVCAR 8.

Як вже говорилося, антитіло Ab №6 пригнічує опосередковану бетацелуліном фосфорилляцію ErbB3. Для того, щоб дослідити чи буде опосередкована бетацелуліном фосфорилляція ErbB3 відбуватись через ErbB1 чи ErbB3, було виконано наступний експеримент.

Клітини ADRr чи клітини MALME-3M ( $1 \times 10^5$ ) попередньо інкубували з 25 мкМ Erbitux (в якості контролю) в 50 мкл буферу з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Після цього до клітин додали 50 мкл 400 нМ біотинильованого BTC і інкубували їх ще 30 хвилин на льоду. Це дало кінцеву концентрацію 12,5 мкМ антитіл і 200 нМ BTC. Потім клітини двічі промили, використовуючи 500 мкл буферу з барвником BD і інкубували зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE (PE = фікоеритрин) (Invitrogen) в буфері з барвником BD впродовж 45 хвилин. Насамкінець, клітини двічі промили, ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD і піддали аналізу на проточному цитометрі FACScalibur. В якості позитивного контролю інкубували  $1 \times 10^5$  клітин ADRr чи MALME-3M з 200 нМ BTC впродовж 30 хвилин на льоду, двічі промивали і інкубували з розведенням 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин. Щоб оцінити фонове забарвлення від кон'югату стрептавідину-PE, клітини інкубували тільки зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин.

Результати цього експерименту представлені на Фіг. 15A-15C. Як показано на Фіг. 15A, бетацелулін не демонструє скільки-небудь помітного зв'язування з негативними щодо ErbB1

клітинами MALME-3М. Однак, як показано на Фіг. 15В і 15С, ВТС дійсно демонструє зв'язування з позитивними щодо ErbB1 клітинами ADRr.

Крім того, як показано на Фіг. 15В і 15С, це зв'язування блокувалось Erbitux'ом, що є анти-EGFR антитілом, яке специфічно зв'язує EGFR, і був включений в якості контролю, щоб продемонструвати, що EGF-подібні ліганди зв'язуються з EGFR, як це описано, наприклад, у Adams et al. (2005), Nature Biotechnology 23, 1147-1157.

Приклад 8: Пригнічення опосередкованого херегуліном проведення сигналів в пухлинних клітинах

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати опосередковане херегуліном проведення сигналів досліджувалась наступним чином.

Клітини MALME-3М висіяли в 96-лункові планшети для тканинної культури і вирощували в середовищі RPMI-1640, доповненому антибіотиками, 2 мМ L-глутаміну і 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS) впродовж 24 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю. В середовищі RPMI-1640 без сироватки, але з антибіотиками і 2 мМ L-глутаміну клітини знаходились впродовж 24 годин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю. Клітини попередньо обробили анти-ErbB3 антитілом (ізотип IgG2 антитіла Ab №6) і без нього в концентрації 1 мкМ, 250 нМ, 63 нМ, 16 нМ, 4,0 нМ, 1,0 нМ, 240 пМ і 61 пМ впродовж 30 хвилин, після чого стимулювали HRG1-beta1-ECD впродовж 10 хвилин при 37°C і 5 % двоокису вуглецю. Потім клітини промили холодним PBS і зібрали буфером для лізису (Pierce, 78505) з білковим екстрактом ссавця (MPER), який містив 150 мМ NaCl, 5 мМ натрію пірофосфату, 10 мкМ bpV (phen), 50 мкМ феналарсину, 1 мМ натрію ортованадату і коктейль інгібіторів протеази (Sigma, P714). Клітинні лізати розвели 2-кратно 4 % альбуміном бичачої сироватки в забуференому фосфатом сольовому розчині з 0,1 % Твін-20 і піддали аналізу ELISA на АКТ (нижче розміщений ефектор ErbB3) і фосфориляцію ErbB3.

Для того, щоб дослідити фосфориляцію АКТ, лізати проганяли на планшеті ELISA з іммобілізованим антитілом, специфічним щодо АКТ, і біотинильованим детекторним антитілом, специфічним до сайту фосфориляції на серині 473 АКТ. Сигнал генерували стрептавідином, кон'югованим до пероксидази хрому, що прореагувала з хемілюмінесцентним субстратом (Pierce, 37070). Щоб кількісно оцінити фосфориляцію ErbB3, лізати проганяли на планшеті ELISA з іммобілізованим антитілом, специфічним до ErbB3 і анти-фосфотирозинним детекторним антитілом, кон'югованим до пероксидази хрому. Це потім реагувало з хемілюмінесцентним субстратом (Pierce, 37070). Результати ELISA візуалізувались за допомогою люменометру.

Як показано на Фіг. 16А і 16В, антитіло Ab №6 є сильним інгібітором опосередкованого херегуліном проведення сигналів в клітинах MALME-3М, про що свідчила знижена фосфориляція ErbB3 (Фіг. 16А) і АКТ (Фіг. 16В). Варто відзначити, що антитіло Ab №6 пригнічувало фосфориляцію АКТ майже на 100 %.

Приклад 9: Пригнічення росту пухлин яєчника, передміхурової залози і підшлункової залози

Щоб оцінити ефективність антитіла Ab №6 in vivo, було використано кілька моделей ксенотрансплантації раку людини на голих мишах, і пригнічення росту пухлин оцінювалось при багаторазовому введенні антитіла. Миші nu/nu з дефіцитом Т-клітин (самки мишей 3-4-тижневого віку з Національного інституту здоров'я (США); аутбредні; альбіносного фенотипу) були придбані у фірми Charles River Labs (США). Клітини MALME-3М для імплантації були вирощені в культурі (середовище RPMI, 10 % FBS, L-глутамін і антибіотики, 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) до приблизно 85 % конфлюентності перед збиранням. Клітини тримали на льоду до імплантації. Мишей імплантували підшкірною ін'єкцією 100 мкл клітин ADRr у правий бік і давали їм відновитись при забезпеченні контролю за початковим пухлинним ростом.

Пухлини вимірювались (довжина на ширину) за допомогою цифрового штангенциркулю; мишам вводили IgG2a (Sigma, M7769-5MG) у вигляді внутрішньовенної ін'єкції. Потім їм вводили інтраперитонеально кожного третього дня 30 мкг чи 300 мкг антитіла №6; пухлини вимірювали тричі на тиждень, заносючи результати в електронну таблицю Microsoft EXCEL.

Після останнього виміру пухлин (L x W) мишей піддавали евтаназії шляхом асфіксії CO<sub>2</sub> і пухлини висікали, швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C (для біохімічного аналізу). Останні виміри пухлин аналізували і будували графіки площі пухлини і об'єму пухлини, як описано, наприклад, в Burtrum et al. (2003) Cancer Res., 63:8912-8921. Отримані дані аналізувались також "нормалізованими" і "ненормалізованими" засобами стосовно площі пухлини і об'єму пухлини. Для "нормалізації" даних в кожний інтервал вимірювання виміри кожної пухлини в кожній групі ділили на початковий розмір пухлини, визначений штангенциркулем.

Дані, отримані на трьох різних моделях, в яких було використано клітинні лінії пухлин людини – ADRr (яєчника), Du145 (передміхурової залози) і OvCAR8 (яєчника), показані на Фіг.

17A-17C, а результати дослідження ксенотрансплантації Colo357 показані на Фіг. 17D. Як можна бачити, 300-мкг доза антитіла Ab №6 кожні три дні (Q3d) забезпечила достовірне пригнічення росту пухлини ( $p < 0,05$  для кількох інтервалів під час дослідження). Більш того, ця інгібітор на дія антитіла Ab №6 посилювалась при підвищенні дози до 600 мкг, Q3d, в моделі раку передміхурової залози Du145, а також в моделях ксенотрансплантації світлоклітинної карциноми і карциноми підшлункової залози (ACHN і COLO357). Однак подальше підвищення дози до 1500 мкг Q3d не приводило до зростання ефективності (OvCAR8 – Фіг. 17; COLO357), що дозволяє припустити, що 600-мкг доза є дозою насичення щодо пригнічення росту пухлини. Фармакокінетичні аналізи сироватки від тварин з цих досліджень демонструють дозозалежне збільшення затримки антитіла Ab №6 в сироватці. Подібно до цього, біохімічний аналіз рівнів антитіла Ab №6 в пухлинах показав дозозалежний діапазон від 0 до ~6 пг MM121/мкг загального пухлинного лізату (дані не приведено).

Приклад 10: Пригнічення зв'язування ErbB3 лігандів з ErbB3 на пухлинних клітинах

В наступному експерименті специфічність антитіл за цим винаходом щодо пригнічення зв'язування ErbB3 лігандів з ErbB3 і не-EGF-подібних лігандів з EGFR досліджувалась таким чином.

В одному експерименті досліджувалась специфічність антитіла Ab №6 і версії Fab антитіла Ab №3 (Ab/Fab №3) щодо пригнічення зв'язування ErbB3 лігандів (наприклад, херегуліну і епірегуліну) з ErbB3.

Щоб дослідити здатність антитіла Ab №6 і антитіла Ab/Fab №3 пригнічувати зв'язування херегуліну з ErbB3, було проведено наступний експеримент.

Клітини ADRr ( $1 \times 10^5$ ) інкубували з 10 мкМ анти-ErbB3 антитіла (наприклад, Ab №6 чи Ab/Fab №3) в 50 мкл буферу з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Потім до цих клітин додали 50 мкл 40 нМ EGF біотинильованого херегуліну і інкубували ще 10 хвилин на льоду. Це дало кінцеву концентрацію 5 мкМ антитіла і 20 нМ EGF херегуліну. Після цього клітини двічі промили, використовуючи 500 мкл буферу з барвником BD, і інкубували зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE (PE = фікоеритрин) (Invitrogen) в буфері з барвником BD впродовж 45 хвилин. Насамкінець, клітини двічі промили, ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD і піддали аналізу на проточному цитометрі FACScalibur. В якості позитивного контролю інкубували  $1 \times 10^5$  клітин ADRr з 20 нМ EGF херегуліну впродовж 10 хвилин на льоду, двічі промили і інкубували з розведенням 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин. Щоб оцінити фонове забарвлення від кон'югату стрептавідину-PE,  $1 \times 10^5$  клітин ADRr інкубували тільки зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин.

Результати цього експерименту наведені на Фіг. 18A і 18B. Як показано на Фіг. 18A і 18B, обидва антитіла Ab №6 і Ab/Fab №3 продемонстрували здатність пригнічувати здатність херегуліну з ErbB3.

Подібно до цього, здатність антитіла Ab №6 пригнічувати зв'язування іншого ErbB3-ліганду епірегуліну з ErbB3 оцінювалась наступним чином.

Клітини ADRr ( $1 \times 10^5$ ) попередньо інкубували з 25 мкМ Erbitux (в якості контролю) в 50 мкл буферу з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Після цього до клітин додали 50 мкл 2 мкМ біотинильованого Ері і інкубували їх ще 30 хвилин на льоду. Це дало кінцеву концентрацію 12,5 мкМ антитіл і 1 мкМ Ері. Потім клітини двічі промили, використовуючи 500 мкл буферу з барвником BD і інкубували зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE (PE = фікоеритрин) (Invitrogen) в буфері з барвником BD впродовж 45 хвилин. Насамкінець, клітини двічі промили, ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD і піддали аналізу на проточному цитометрі FACScalibur. В якості позитивного контролю  $1 \times 10^5$  клітин ADRr інкубували з 200 нМ BTC впродовж 30 хвилин на льоду, двічі промивали і інкубували з розведенням 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин. Щоб оцінити фонове забарвлення від кон'югату стрептавідину-PE, клітини інкубували тільки зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-PE впродовж 45 хвилин.

Результати цього експерименту наведені на Фіг. 19A і 19B. Як показано на Фіг. 19A, епірегулін зв'язується з клітинами ADRr, позитивними щодо ErbB3. Більш того, як показано на Фіг. 19B, це зв'язування пригнічується і Erbitux, і антитілом Ab №6, що засвідчує здатність епірегуліну зв'язуватись і з EGFR, і з ErbB3.

Наступний експеримент було здійснено для дослідження того, чи здатне антитіло Ab №6 пригнічувати зв'язування EGF-подібного ліганду (наприклад, HB-EGF) до пухлинних клітин.

Клітини ADRr ( $1 \times 10^5$ ) попередньо інкубували з 25 мкМ антитіла Ab №6 чи з 25 мкМ Erbitux (в якості контролю) в 50 мкл буферу з барвником BD впродовж 30 хвилин на льоду. Після цього до клітин додали 50 мкл 400 нМ біотинильованого HB-EGF і інкубували їх ще 30 хвилин на льоду. Це дало кінцеву концентрацію 12,5 мкМ антитіл і 200 нМ HB-EGF. Потім клітини двічі промили, використовуючи 500 мкл буферу з барвником BD і інкубували зі 100 мкл розведення

1:200 стрептавідину-РЕ (РЕ = фікоеритрин) (Invitrogen) в буфері з барвником BD впродовж 45 хвилин. Насамкінець, клітини двічі промили, ресуспендували в 300 мкл буферу з барвником BD і піддали аналізу на проточному цитометрі FACScalibur. В якості позитивного контролю  $1 \times 10^5$  клітин ADRr інкубували з 200 нМ HB-EGF впродовж 30 хвилин на льоду, двічі промили і інкубували з розведенням 1:200 стрептавідину-РЕ впродовж 45 хвилин. Щоб оцінити фонове забарвлення від кон'югату стрептавідину-РЕ, клітини інкубували тільки зі 100 мкл розведення 1:200 стрептавідину-РЕ впродовж 45 хвилин.

Як показано на Фіг. 20А і 20В, HB-EGF зв'язується з ErbB на клітинах ADRr і антитіло Ab №6 не пригнічує це зв'язування, а це засвідчує, що антитіло Ab №6 є специфічним щодо зв'язування ErbB3 лігандів (наприклад, херегуліну і епірегуліну) з ErbB3.

Приклад 11: Пригнічення секреції VEGF в пухлинних клітинах

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати секрецію VEGF клітин, що експресують ErbB3 (наприклад, ракових клітин) досліджувалась за допомогою аналізу секреції судинного ендотеліального фактору росту (набір VEGF ELISA від R&D Systems, США, кат. № DY293B). Спочатку аналізували здатність антитіла Ab №6 пригнічувати секрецію VEGF в необроблених і оброблених HRG-бета 1 клітинах MCF-7, T47D і COLO-357. Це дослідження показало, що клітини COLO-357 секретують в середовище найбільшу кількість VEGF. Оскільки ці клітини мають також дуже високі рівні HRG (дані не наведені), то додавання HRG до середовища було нездатним далі індукувати секрецію VEGF (Фіг. 24А). В той самий час, HRG був здатним індукувати секрецію VEGF в клітинах MCF-7 і T47D.

Антитіло Ab №6 демонструє сильну інгібіторну дію при високих рівнях у всіх трьох клітинних лініях, причому найсильнішим цей ефект був у клітинах COLO-357 (Фіг. 24А). Антитіло Ab №6 демонструє подібний ефект також *in vivo*, пригнічуючи секрецію VEGF в трьох різних ксенотрансплантатах, причому найсильнішим цей ефект був у ксенотрансплантаті COLO-357 (Фіг. 24В). Пригнічення VEGF корелює з пригніченням фосфорилляції ErbB3 (Фіг. 24 С). Пригнічення секреції VEGF корелює також з пригніченням ангиогенезу в пухлинних клітинах. Зокрема, було встановлено, що фактори, які секретуються клітинами мієломи, такі як VEGF і bFGF, запускають ангиогенез (дивись, наприклад, Leung et al. (1989) Science 246(4935):1306-9; Yen et al. (2000) Oncogene 19(31):3460-9).

Приклад 12: Пригнічення міграції клітин

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати міграцію клітин, що експресують ErbB3 (наприклад, клітин MCF-7), досліджувалась за допомогою транс-лункового аналізу (Millipore Corp., США, кат. № ECM552). Спочатку клітини MCF-7 витримали впродовж ночі без сироватки, а потім інкубували в присутності чи за відсутності антитіла Ab №6 (кінцева концентрація 8 мкМ) впродовж 15 хвилин при кімнатній температурі. Після цього клітини перенесли у верхню камеру, відділену від нижньої камери мембраною, покритою колагеном типу 1, через яку клітини можуть мігрувати. До середовища в нижній камері додавали 10 % FBS в якості хемоатрактанту в присутності чи за відсутності антитіла Ab №6. Камери інкубували при 37°C впродовж 16 годин, після чого клітини, що мігрували через мембрану, видаляли за допомогою буферу для відщеплення і інкубували з флуоресцентним барвником, що зв'язується з клітинами. Середня флуоресценція  $\pm$  стандартна похибка середнього показані на Фіг. 25.

Як показано на Фіг. 25, 10 % FBS стимулює міграцію клітин (смуга 3), порівняно з необробленим контролем (смуга 1), а 8 мкМ антитіла Ab №6 пригнічують індуковану FBS міграцію клітин (смуга 4).

Приклад 13: Пригнічення сфероїдального росту

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати сфероїдальний ріст клітин, що експресують ErbB3, досліджувалась за допомогою аналізу, який апроксимує умови пухлинного росту (Herman et al. (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication). Сфероїди ADRr і DU145 були ініційовані з частотою 1 сфероїд на лунку з 96-лункової планшети з використанням методу висячої краплі (Herrman et al., 2008). Індивідуальні сфероїди потім обробляли антитілом Ab №6 (кінцева концентрація 8 мкМ), доменом EGF херегуліну- $\beta$ 1 (R&D Systems, США, кат. № 396-HB, кінцева концентрація 3,4 нМ) чи їх комбінацією, як вказується. Діаметри сфероїдів вимірювали за допомогою світлового мікроскопу (об'єтив X10) в день 1 і день 13.

Антитіло Ab №6 пригнічує ріст сфероїдів в клітинах ADRr (Фіг. 26А). Крім того, 3,4 нМ HRG стимулюють ріст сфероїдів, а антитіло Ab №6 пригнічує цю дію HRG (Фіг. 26В). Сфероїди з клітин DU145 не збільшились у розмірі протягом 13 днів експерименту; однак ріст значно стимулювався при додаванні HRG1-бета 1. В цих клітинах антитіло Ab №6 в концентрації 8 мкМ пригнічує індукований HRG ріст сфероїдів (Фіг. 26С).

Приклад 14: Пригнічення проведення сигналів

Досліджувалась здатність антитіла Ab №6 пригнічувати проведення сигналів, індукованих різними лігандами. Наприклад, вивчався вплив антитіла Ab №6 на зв'язування HRG і BTC з клітинами AdrR, що експресують рецептор ErbB3. Як показано на Фіг. 27A і 27B, за даними аналізу FACS антитіло Ab №6 конкурує з HRG, але не з BTC, за зв'язування з клітинами AdrR. Відповідно, блокування антитілом Ab №6 зв'язування HRG з ErbB3 попереджає проведення сигналів, індукованих HRG.

Додатково різні ліганди тестувались щодо стимуляції фосфориляції ErbB3. Три ліганди - HRG, BTC і HGF – демонстрували здатність стимулювати індуковану ErbB3 фосфориляцію в клітинах AdrR, тоді як EGF такої здатності не демонстрував. Як показано на Фіг. 28, антитіло Ab №6 пригнічує індуковану HGF фосфориляцію pErbB3 в клітинах AdrR (Фіг. 28). При цьому відомо (дивись, наприклад, Wallenius et al. (2000) *Am J Pathol.* 156 (3):821-9 10702398), що посилене проведення сигналів HGF виявляється в різних епітеліальних і не епітеліальних пухлинах.

Взаємодія ErbB3/cMET і роль антитіла Ab №6 в модуляції цієї взаємодії

Було показано, що недрібноклітинна карцинома легень, що несе активуючі мутації в рецепторі епідермального фактору росту (EGFR), розвиває резистентність до інгібіторів тирозинкінази, мобілізуючи MET і HER3 і, тим самим, активуючи шлях виживання клітин PI3K-AKT (Engelmann et al. (2007) *Science* 316: 1039-1043; Gou (2007) *PNAS*: 105(2): 692-697). Зв'язок між EGFR і c-MET в клітинних лініях, які несуть активуючі мутації EGFR було добре встановлено за допомогою ко-імунопреципітації (Engelmann et al., 2007; Gou, 2007). Guo et al. недавно продемонстрували за допомогою ко-імунопреципітації, що c-MET і ErbB3 існують у комплексі також у шлунковій клітинній лінії MKN45, яка відома залежністю від посиленого c-MET.

Така взаємодія c-MET-ErbB3 спостерігається також в клітинах AdrR, що несуть EGFR дикого типу і не залежать від посиленого c-MET. HGF (фактор росту гепатоцитів) індукує фосфориляцію ErbB3 в клітинах AdrR дозозалежним чином, як показано на Фіг. 28. До того ж, антитіло Ab №6 пригнічує індуковану HGF фосфориляцію ErbB3.

Досліджувався також вплив HRG і BTC на фосфориляцію ErbB1 і ErbB3, і було встановлено, що HRG і BTC індукують фосфориляцію ErbB1 і ErbB3. Виявилось, що HRG є більш сильним індуктором фосфориляцію ErbB3, тоді як BTC є сильним індуктором фосфориляції ErbB1 (Фіг. 29). Ця фосфориляція вірогідно запускається комплексом між ErbB1 і ErbB3. Коротко кажучи, зв'язування HRG з ErbB3 індукує утворення комплексу між ErbB1 і ErbB3, що приводить до фосфориляції і ErbB1, і ErbB3.

Пригнічення антитілом стимульованої лігандом (HRG, BTC, EGF і HGF) фосфориляції ErbB3

Здатність антитіла Ab №6 пригнічувати індуковану лігандом (HRG, BTC, EGF і HGF) фосфориляцію ErbB3 досліджувалась за наступною методикою:

1. Клітини AdrR наносять на 96-лункову планшету зі щільністю 30000 клітин/лунку/100 мкл в середовищі RPMI, яке містить 10 % FBS, і дають рости впродовж ночі.

2. Наступного дня клітин позбавляють сироватки, для чого замінюють середовище на таке, що не містить FBS, і дають рости впродовж ночі.

3. Клітини попередньо обробляють різними концентраціями антитіла Ab №6 (від 0,01 нМ до 100 нМ) чи буфером (контроль) впродовж 2 годин.

4. Потім клітини стимулюють, використовуючи 10 нМ HRG і HGF впродовж 10 хвилин або 10 нМ BTC і EGF впродовж 5 хвилин.

5. Реакцію припиняють, видаляючи культуральне середовище і промиваючи клітини один раз льодовою холодною PBS.

6. Потім клітини піддають лізису в 25 мМ Tris, pH+7,5; 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1,0 % Triton X-100, 1,0 % CHAPS, 10 % в/в гліцерину, доповненому 1X інгібітору протеази і 1X інгібітору фосфатази.

7. В клітинних лізатах вимірюють фосфориляцію ErbB3 з використанням набору Human Phospho-ErbB3 ELISA (R&D Systems, США, кат. № DYC1769) у відповідності до інструкцій виробника.

Пригнічення антитілом утворення білкового комплексу ErbB2-ErbB3

Клітини AdrR попередньо інкубували з буфером (контроль) або з 250 нМ антитіла Ab №6 впродовж 60 хвилин при кімнатній температурі, після чого обробили 10 нМ HRG чи 10 нМ BTC чи контрольним буфером впродовж 10 хвилин. Потім клітини піддали лізису в 25 мМ Tris, pH+7,5; 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1,0 % Triton X-100, 1,0 % CHAPS, 10 % в/в гліцерину, доповненому 0,2 мМ PMSF, 50 мТО/мл апротиніну і 100 мкМ лейпептину. Неочищений лізат нетривало центрифугували для видалення нерозчинного матеріалу. Супернатант (надосадовий шар) перенесли в нову пробірку Епендорфа і додали анти-ErbB3 антитіло (Santa Cruz sc-285) в розведенні 1:500. Супернатанти інкубували впродовж ночі при обережному струшуванні при 4°C. 60 мкл бусинок іммобілізованого білку A/G агарози (Pierce, США, кат. № 20421) спочатку



промили 1X PBS. Суміш клітинний лізат-антитіло додали до промитих PBS бусинок і інкубували впродовж 2 годин при обережному струшуванні при 4<sup>0</sup>C. Потім імунопреципітати тричі промивали льодяної температури буфером для лізису, ресуспендували в 30 мкл 2X SDS буферу для зразка (SDS = додецилсульфат натрію), піддавали термічній денатурації при 95<sup>0</sup>C впродовж 7 хвилин і проганяли на 4-12 % Bis-Tris гелях, аналізували методом електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) і перенесли на PVDF мембрану в три-гліциновому буфері з 10 % MeOH. Мембрану блокували впродовж 1 години в 10 мл блокуючого буферу (Li-Cor Biosciences, США, кат. № 927-40000), після чого інкубували з анти-ErbB2 антитілом в розведенні 1:1000 (Cell Signaling Technology, США, кат. № 29D8) в 10 мл блокуючого буферу (Li-Cor Biosciences, кат. № 927-40000). Сигнал виявляли за допомогою IRDye800 козла проти кролика в розведенні 1:5000 (2 мкл) в 10 мл блокуючого буферу (Li-Cor Biosciences, кат. № 927-40000).

Було показано також, що антитіло Ab №6 повністю пригнічує стимульоване HRG утворення комплексу ErbB2/3 (Fig. 29B).

#### Еквіваленти

Спеціалісти в цій галузі мають визнати чи зможуть переконатись в тому, що шляхом не більше, ніж рутинного експериментування, можна знайти багато еквівалентів конкретних варіантів здійснення описаного тут винаходу. Такі еквіваленти вважаються такими, що охоплюються наступною формулою винаходу. Будь-яка комбінація варіантів здійснення, розкритих в залежних пунктах формули винаходу, входить до об'єму даного винаходу.

#### Включення за посиланням

Всі публікації, патенти і патентні заявки, що розглядаються, згадані тут, вважаються включеними в даний опис в повному об'ємі за посиланням.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> МЕРРИМАК ФАРМАСЬОТИКАЛЗ, ІНК.

<120> АНТИТІЛА ПРОТИ ЕРВВЗ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

<130> MMJ-001PC

<140> PCT/US2008/002119

<141> 2008-02-15

<150> 60/901,904

<151> 2007-02-16

<150> 61/009,796

<151> 2008-01-02

<160> 53

<170> Патент у версії 3.3

<210> 1

<211> 119

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 111  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний поліпептид"

<400> 2

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

<210> 3  
 <211> 118  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний поліпептид"

<400> 3

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 4  
<211> 110  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn  
20 25 30

Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Ser  
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu  
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 5  
<211> 122  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 5

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr  
20 25 30

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

<210> 6  
<211> 106  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 6  
Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Tyr Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val  
20 25 30  
Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr  
35 40 45  
Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val  
85 90 95  
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 7  
<211> 5  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність  
<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 7  
His Tyr Val Met Ala  
1 5

<210> 8  
<211> 17  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 8  
Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 9  
<211> 10  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 9  
Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 10  
<211> 14  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 10  
Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Val Val Ser  
1 5 10

<210> 11  
<211> 7  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 11  
 Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 12  
 Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Phe Val Ile  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 5  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 13  
 Ala Tyr Asn Met Arg  
 1 5

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 14  
 Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 15  
 <211> 9

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 15

Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
1 5

<210> 16

<211> 13

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 16

Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Ile Tyr  
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 17

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser  
1 5

<210> 18

<211> 11

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 18

Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val  
1 5 10

<210> 19

<211> 5

<212> ЗТП



<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 19

Ala Tyr Gly Met Gly  
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 20

Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 13

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 21

Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 22

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val Ser  
1 5 10

<210> 23  
 <211> 8  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 23  
 Tyr Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 24  
 <211> 9  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 24  
 Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val  
 1 5

<210> 25  
 <211> 357  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

<400> 25  
 gaggtgcagc tgctggagag cggcggaggg ctggtccagc caggcggcag cctgaggctg 60  
 tcctgcgccg ccagcggctt caccttcagc cactacgtga tggcctgggt gcggcaggcc 120  
 ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccagc atcagcagca gcggcggctg gaccctgtac 180  
 gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac caggggcctg 300  
 aagatggcca ccactctoga ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc 357

<210> 26  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
  
 <220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

<400> 26  
 cagtcggccc tgacccagcc cgccagcgtg agcggcagcc caggccagag catcaccatc 60

```

agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc agctacaacg tgggtgtcctg gtatcagcag 120
caccgccggca agggccccc aa gctgatcatc tacgaggtgt cccagaggcc cagcggcgtg 180
agcaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctg 240
cagaccgagg acgaggccga ctactactgc tgcagctacg ccggcagcag catcttcgtg 300
atcttcggcg gagggaccaaa ggtgaccgtc cta 333

```

<210> 27  
 <211> 354  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```

<400> 27
gaggtgcagc tgctggaaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
tcctgcgccg ccagcggctt caccctcagc gcctacaaca tgagatgggt gcggcaggcc 120
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccgtg atctacccca gcggcggagc caccagatac 180
gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caggggctac 300
tactactacg gcatggacgt gtggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc 354

```

<210> 28  
 <211> 330  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```

<400> 28
cagagcgtgc tgacccagcc cccaagcgcc agcggcaccc caggccagag ggtgaccatc 60
agctgcagcg gcagcgacag caacatcggc aggaactaca tctactggta tcagcagttc 120
cccgccaccg cccccaagct gctgatctac aggaacaacc agaggcccag cggcgtgccc 180
gacaggatca gcggcagcaa gagcggcacc agcggccagcc tggccatcag cggcctgaga 240

agcagggacg aggccgagta ccactgcggc acctgggacg acagcctgag cggcccagtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

```

<210> 29  
 <211> 366  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```

<400> 29
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctggtgggtc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gcttacggtg tgggttggtg tcgccaagct 120
cctggtaaaag gtttgagtg ggtttcttat atctctcctt ctggtggcca tactaagtat 180

```

```
gctgactccg ttaaagggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtactg 300
gaaactggct tattggttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcaagc 366
```

<210> 30  
 <211> 318  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```
<400> 30
cagtacgaat tgactcagcc accctcagtg tccgtgtacc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagatcaatt ggggagtaaa tttgtttcct ggtatcagca gaggccaggc 120
cagtcacctg tgttggtcat gtataaagat aaaaggcggc cgtcagagat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctata 240
gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggcactggg 300
accaaggtca ccgtccta 318
```

<210> 31  
 <211> 357  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```
<400> 31
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtgggtc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct cattacgtta tggcttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaaag gtttgagtg ggtttcttct atctcttctt ctgggtggctg gactctttat 180
gctgactccg ttaaagggtcg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac tagaggctctc 300
aagatggcta caatttttga ctactggggc cagggcacc cttgacccgt ctcaagc 357
```

<210> 32  
 <211> 333  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний полінуклеотид"

```
<400> 32
cagagcgctt tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
tcttgcaact gaaccagcag tgatgttggg agttataatg ttgtctcctg gtaccaacaa 120
caccagggca aagcccccaa actcatcatt tatgaggcca gtcagcggcc ctcaggggtt 180
tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacaat ctctgggctc 240
cagactgagg acgaggctga ttattactgc tgctcatatg caggtagtag tattttcgtg 300
```

atattcggcg gagggaccaа ggtgaccgtc cta

333

<210> 33

<211> 354

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний полінуклеотид"

<400> 33

```
gaagttcaat tgttagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtgggtc tttacgtctt 60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct gcttacaata tgcgttgggt tcgccaagct 120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttctgtt atctatcctt ctgggtggcg tactcgttat 180
gctgactccg ttaaaggctg cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac 240
ttgcagatga acagcttaag ggtgaggac acggcgtgt attactgtgc gagagggtaс 300
tactactacg gtatggacgt ctggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc aagc 354
```

<210> 34

<211> 330

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний полінуклеотид"

<400> 34

```
cagagcgtct tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcgtgttctg gaagcgactc caacatcgga agaaattata tatattggtа ccagcaattc 120
ccaggaacgg cccccaagct cctcatctat aggaataatc agcgccctc aggggtccct 180
gaccgaatct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg 240
tccgaggatg aggtgagta tcactgtgga acatgggatg acagcctgag tggtcoggta 300
ttcggcgag ggactaagct gaccgtccta 330
```

<210> 35

<211> 118

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 35

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
      20           25           30

Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35           40           45
```

Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 36  
<211> 108  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 36  
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp  
20 25 30

Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln  
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro  
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

<210> 37  
<211> 119  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 37

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

<210> 38

<211> 110

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний поліпептид"

<400> 38

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

<210> 39  
 <211> 5  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 39  
 Trp Tyr Gly Met Gly  
 1 5

<210> 40  
 <211> 17  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 40  
 Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 41  
 <211> 9  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 41  
 Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val  
 1 5

<210> 42  
 <211> 11  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 42



Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp Ser Leu Asn  
1 5 10

<210> 43  
<211> 7  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 43  
Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
1 5

<210> 44  
<211> 9  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 44  
Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro Phe Thr  
1 5

<210> 45  
<211> 5  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 45  
Arg Tyr Gly Met Trp  
1 5

<210> 46  
<211> 17  
<212> ЗТП  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид"

<400> 46  
Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Gly

<210> 47  
 <211> 10  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 47  
 Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser  
     1                    5                    10

<210> 48  
 <211> 14  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 48  
 Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp Asn Ile Val Ser  
     1                    5                    10

<210> 49  
 <211> 7  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 49  
 Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser  
     1                    5

<210> 50  
 <211> 10  
 <212> ЗТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний пептид"

<400> 50

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val  
1 5 10

<210> 51

<211> 111

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 51

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr  
20 25 30

Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser  
85 90 95

Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 52

<211> 108

<212> ЗТП

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
Синтетичний поліпептид"

<400> 52

Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp  
20 25 30

Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser

```

          50              55              60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln
 65              70              75              80
Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro
          85              90              95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg
          100              105

```

<210> 53  
 <211> 110  
 <212> 3ТП  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> / примітка="Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний поліпептид"

```

<400> 53
Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1              5              10              15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
          20              25              30
Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
          35              40              45
Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
          50              55              60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
          65              70              75              80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
          85              90              95
Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100              105              110

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

1. Виділене моноклональне антитіло, або його частина, яка зв'язує антиген, що зв'язується з ErbB3, яке включає:

- a) варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7;
- b) варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8;
- 10 c) варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9;
- d) варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10;
- e) варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та
- f) варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.

15 2. Виділене моноклональне антитіло, або його частина, що зв'язує антиген, що зв'язується з ErbB3, яке включає варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 1, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 2.

3. Антитіло, або його частина, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1, 2, де антитіло, вибране з групи, що включає людське антитіло, гуманізоване антитіло, біспецифічне антитіло та химерне антитіло.
4. Антитіло, або його частина, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло або його частина, що зв'язує антиген, вибране з групи, що включає: Fab, Fab'2, ScFv, SMIP, афітіло, авімер, нанотіло та домен-специфічне антитіло.
5. Антитіло, або його частина, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-4, де ізотип антитіла, вибраний з групи, що включає: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD та IgE антитіло.
6. Антитіло за п. 5, де антитіло є являє собою антитіло ізотипу IgG2.
7. Композиція, що включає антитіло, або його частину, що зв'язує антиген, за будь-яким з попередніх пунктів, у фармацевтично-прийнятному носії.
8. Композиція за п. 7, яка представлена у формі стерильного водного розчину чи дисперсії, придатної для ін'єкції або інфузії, або представлена у формі стерильного порошку для екстемпорального приготування стерильного ін'єкційного розчину чи дисперсії, придатних для ін'єкції або інфузії.
9. Спосіб одержання стерильного водного розчину за п. 8, у якому виконують мікрофільтрацію зі стерилізацією водного розчину, що містить антитіло, або його частину, що зв'язує антиген, у фармацевтично-прийнятному носії.
10. Виділене моноклональне антитіло, яке зв'язується з ErbB, що містить варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів, де варіабельна ділянка важкого ланцюга кодована нуклеїновою кислотою, що включає SEQ ID NO: 25, та варіабельна ділянка легкого ланцюга кодована нуклеїновою кислотою, що включає SEQ ID NO: 26.
11. Трансгенний ссавець, що не є людиною, який експресує моноклональне антитіло чи його частину, що зв'язує антиген, за п. 1 або за п. 2.
12. Трансгенна рослина, що експресує моноклональне антитіло чи його частину, що зв'язує антиген, за п. 1 або за п. 2.
13. Гібридома, яка продукує антитіло чи його частину, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-6.
14. Гібридома, яка продукує антитіло людини чи його частину, що зв'язує антиген, за п. 1 або 2, де це антитіло кодується: нуклеотидною послідовністю варіабельної ділянки важкого ланцюга, наведеною в SEQ ID NO: 25 та нуклеотидною послідовністю варіабельної ділянки легкого ланцюга, наведеною в SEQ ID NO: 26.
15. Набір, який містить одне чи більше виділених моноклональних антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, за будь-яким з пп. 1-6, і включає інструкції щодо їх використання в лікуванні хвороби, яка асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів.
16. Набір, який містить одне чи більше виділених моноклональних антитіл чи їх частин, що зв'язують антиген, за будь-яким з пп. 1-6, і включає інструкції щодо їх використання в діагностиці хвороби, яка асоціюється із залежним від ErbB3 проведенням сигналів.
17. Набір за п. 15 або п. 16, де хворобою є рак.
18. Спосіб пригнічення проведення сигналів ErbB3 у суб'єкта, який включає введення цьому суб'єкту виділеного моноклонального антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-6, у кількості, достатній для пригнічення проведення сигналів ErbB3.
19. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який включає введення цьому суб'єкту терапевтично ефективною кількістю виділеного моноклонального антитіла чи його частини, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-6, у кількості, достатній для лікування раку.
20. Спосіб за п. 18 або п. 19, де антитіло, або його частина, яка зв'язує антиген, включає: варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.
21. Спосіб за п. 18 або п.19, де антитіло, або його частина, яка зв'язує антиген включає: варіабельну ділянку важкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 1 та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що включає SEQ ID NO: 2.
22. Спосіб за будь-яким з пп. 19-21, де рак вибирається з групи, що містить меланому, рак молочної залози, рак яєчника, світлоклітинну карциному, рак шлунково-кишкового тракту/ободової кишки, рак легень, світлоклітинну саркому і рак передміхурової залози.
23. Спосіб за будь-яким з пп. 18-22, де суб'єктом є людина.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 18-23, де антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, вводяться суб'єкту внутрішньовенно, внутрішньом'язово чи підшкірно.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 19-24, де антитіло чи його частина, що зв'язує антиген, вводяться в комбінації з другим терапевтичним препаратом.

26. Спосіб за п. 25, де другим препаратом є друге антитіло чи його частина, що зв'язує антиген.

27. Спосіб за п. 25, де другим препаратом є протираковий препарат.

5 28. Спосіб за п. 27, де протираковий препарат вибирають з групи, що містить антитіло, невелику молекулу, антиметаболіт, алкілюючий агент, інгібітор топоізомерази, препарат, націлений на мікротрубки, інгібітор кінази, інгібітор синтезу білка, імунотерапевтичний препарат, гормон чи його аналог, аналог соматостатину, глюкокортикоїд, інгібітор ароматази, невелику молекулу, спрямовану на EGFR, і інгібітор mTOR.

10 29. Спосіб за п. 28, де антитіло є анти-IGF1R антитілом, анти-EGFR антитілом чи анти-cMET антитілом.

30. Спосіб за п. 28, де невелика молекула зв'язує IGF1R, EGFR або cMET.

31. Спосіб за п. 28, де невелика молекула, спрямована на EGFR, являє собою гефітиніб, лапатиніб або ерлотиніб.

15 32. Спосіб діагностики раку, асоційованого з ErbB3, у суб'єкта, який включає (а) контактування *ex vivo* клітин від цього суб'єкта з виділеним моноклональним антитілом чи його частиною, що зв'язує антиген, за будь-яким з пп. 1-6, та (b) визначення рівня зв'язування з ErbB3 на вказаних клітинах, де незвичайно великі рівні зв'язування з ErbB3 вказують на те, що суб'єкт має рак, пов'язаний з ErbB3.

20 33. Антитіло, яке є:  
виділеним повнорозмірним моноклональним IgG антитілом,  
зв'язується з ErbB3 з  $K_D$  приблизно 4 нМ, як визначено із застосуванням аналізу поверхневого плазмонного резонансу або аналізу зв'язування клітин, з використанням клітин MALME-3М, та

25 включає варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.

30 34. Антитіло, яке є:  
виділеним повнорозмірним моноклональним IgG антитілом,  
зв'язується з ErbB3,  
знижує регуляцію ErbB3 рецептора в клітинах MALME-3М так, що при концентрації антитіла 100 нМ, рівні ErbB3 на поверхні клітин знижуються принаймні на 50 %, і

35 включає варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.

40 35. Антитіло, яке є:  
виділеним повнорозмірним моноклональним IgG антитілом,  
зв'язується з ErbB3,  
показує  $IC_{50}$  для бетацелюлін-опосередкованого фосфорилювання ErbB3, що становить від  $5,32 \cdot 10^{-10}$  М до  $1,32 \cdot 10^{-9}$  М у клітинах ADRr, стимульованих за допомогою бетацелюліну, та

45 включає варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.

50 36. Антитіло, яке є:  
виділеним повнорозмірним моноклональним IgG антитілом,  
зв'язується з ErbB3,  
при концентрації 63 нМ, викликає зменшення у херегулін-опосередкованому фосфорилюванні АКТ на приблизно 100 % в клітинах MALME-3М, та

55 включає варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 7; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 8; варіабельну ділянку важкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 9; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR1, що включає SEQ ID NO: 10; варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR2, що включає SEQ ID NO: 11; та варіабельну ділянку легкого ланцюга CDR3, що включає SEQ ID NO: 12.



Fig. 1A

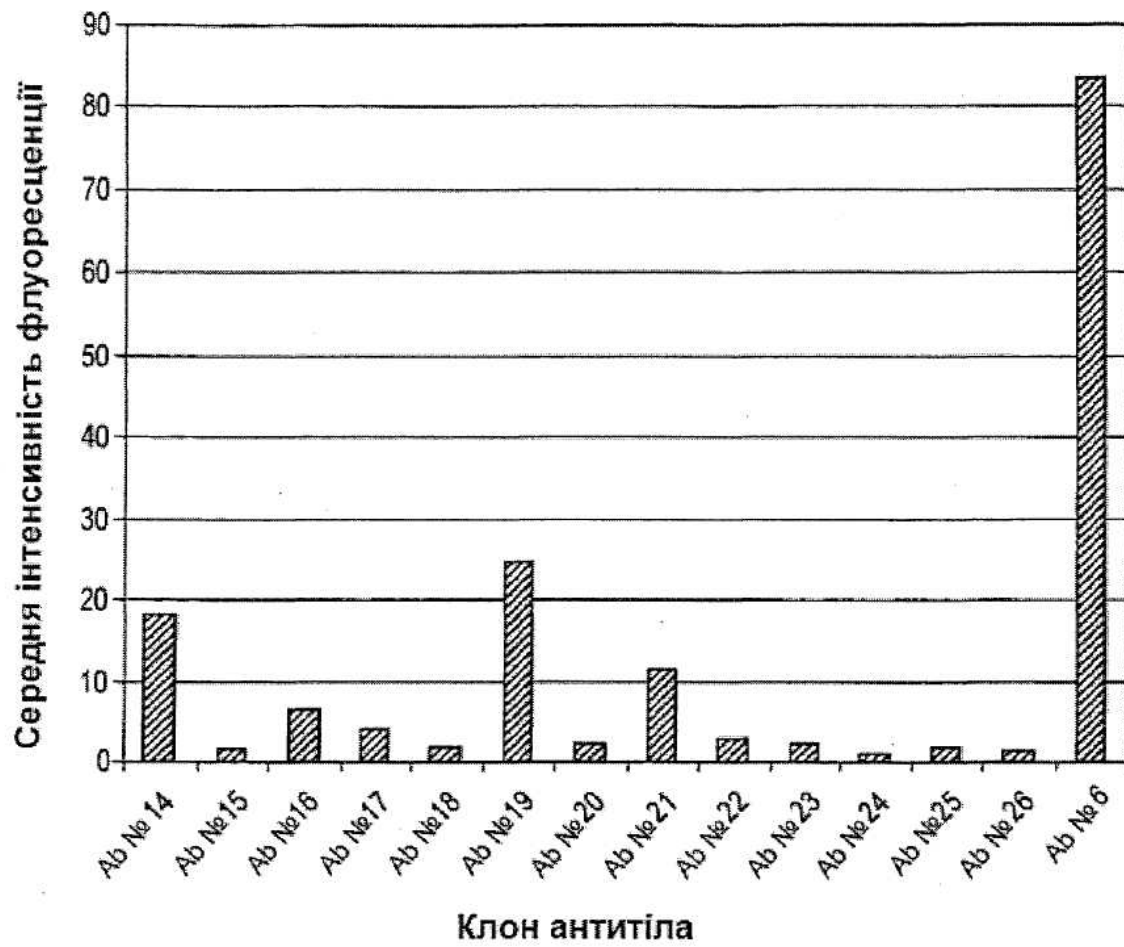


Fig.1B

Зв'язування антитіл з ErbB3, оцінюване за допомогою поверхневого  
плазмонного резонансного аналізу (SPR)

$$K_D = k_d/k_a$$

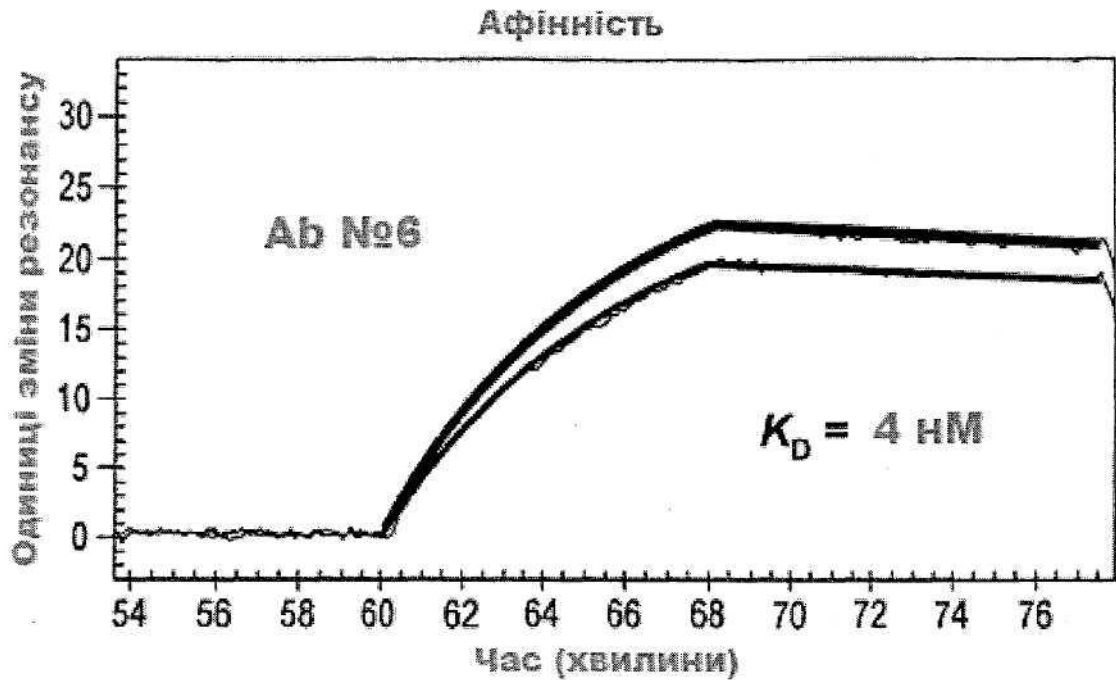


Fig. 2A

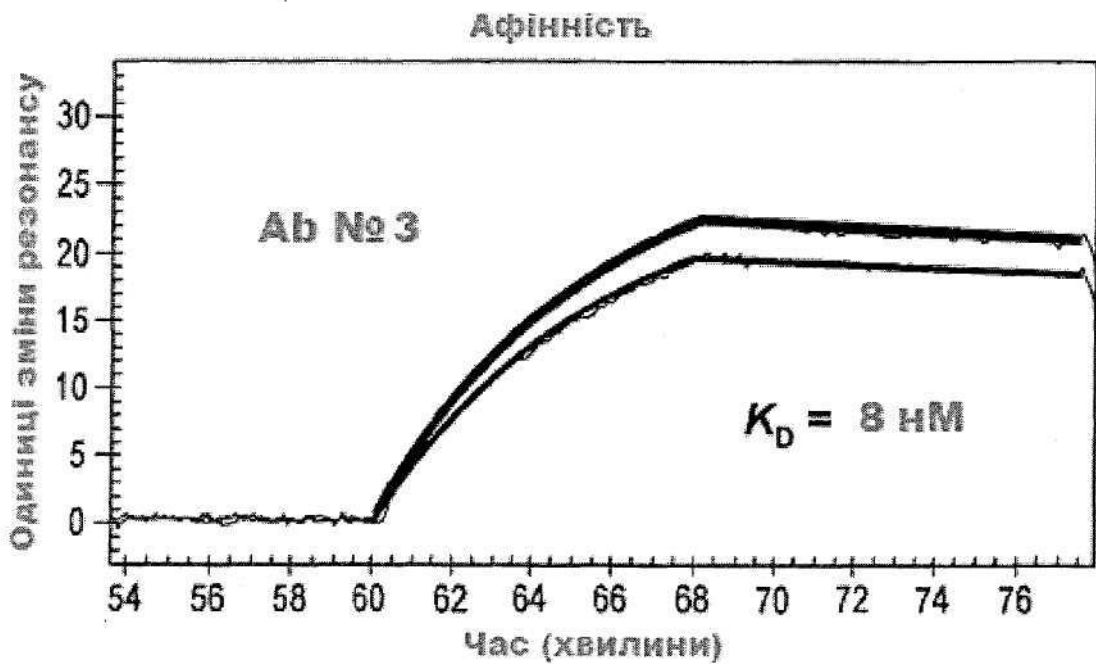


Fig. 2B



Проби на зв'язування з використанням клітин меланоми MALME-3M

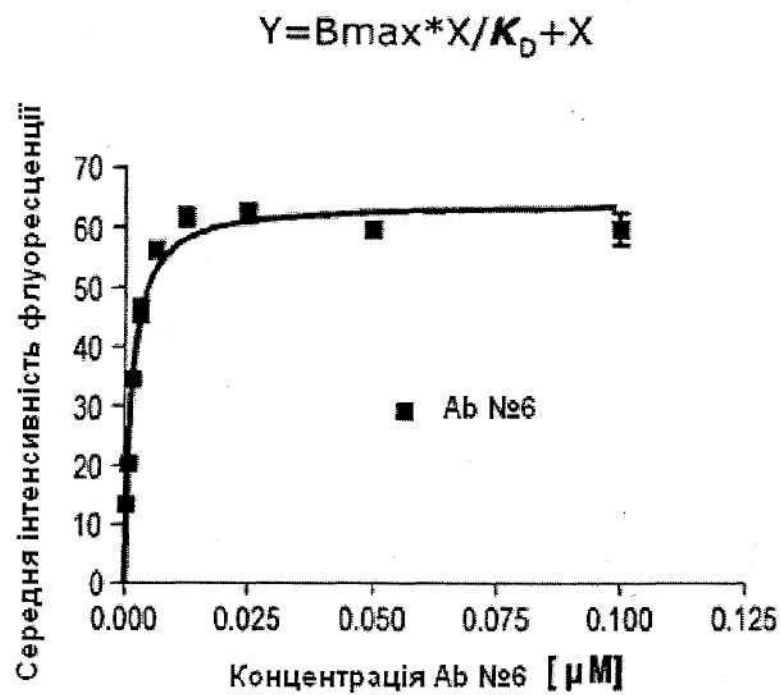


Fig. 2C

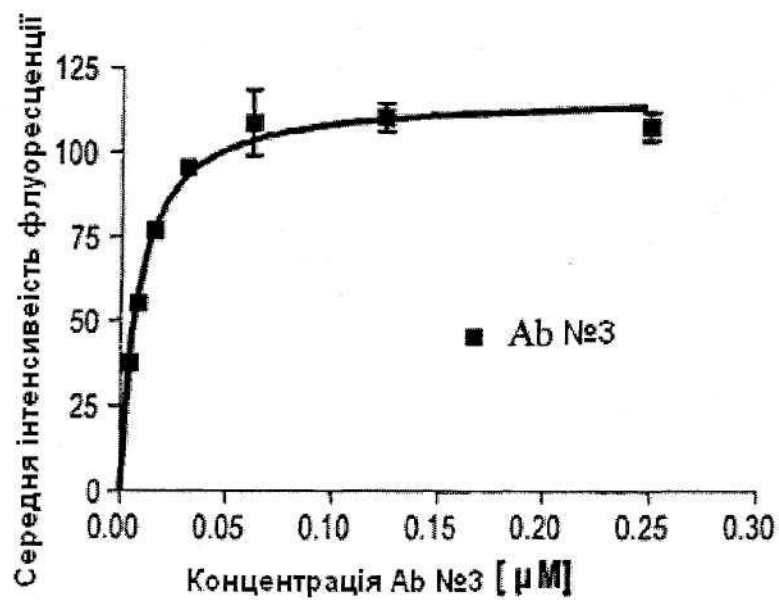
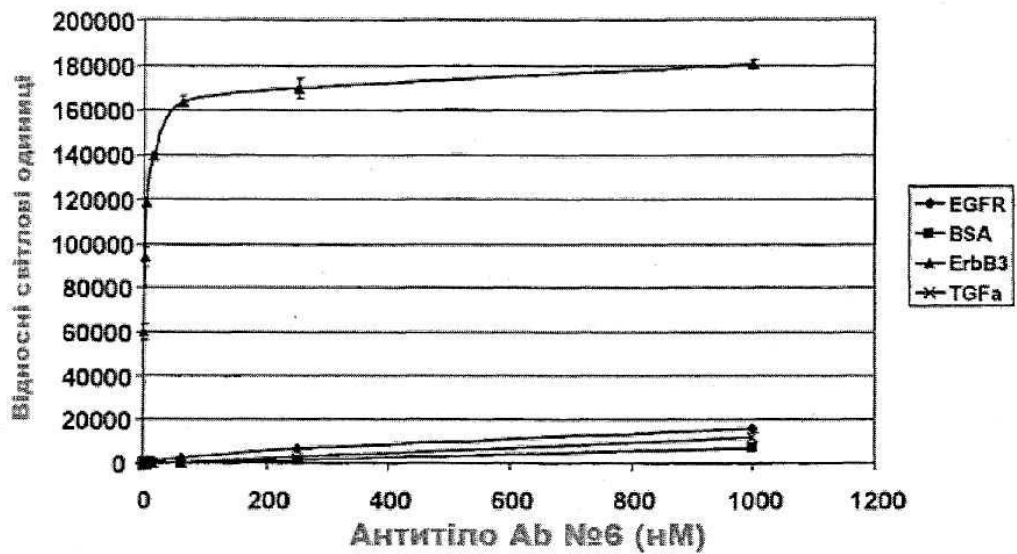


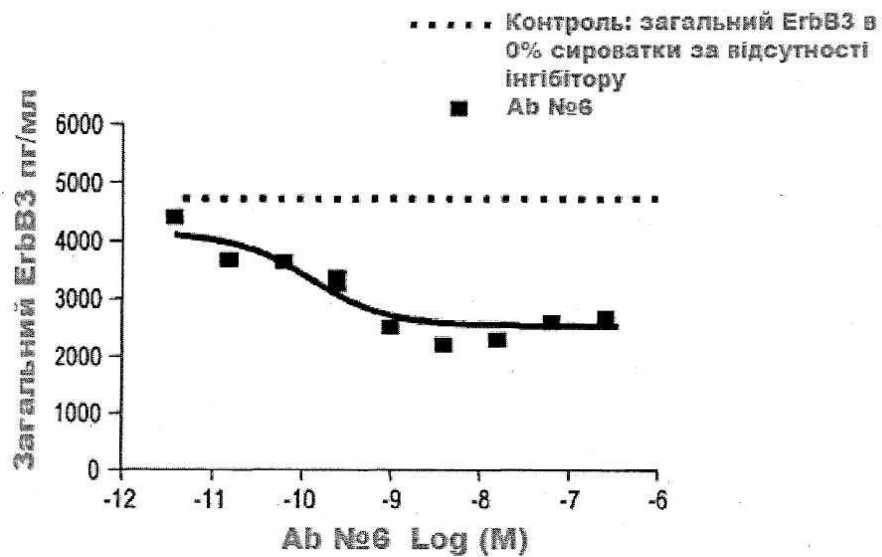
Fig. 2D

Зв'язування IgG2 антитіла Ab №6 з ErbB3 є специфічним



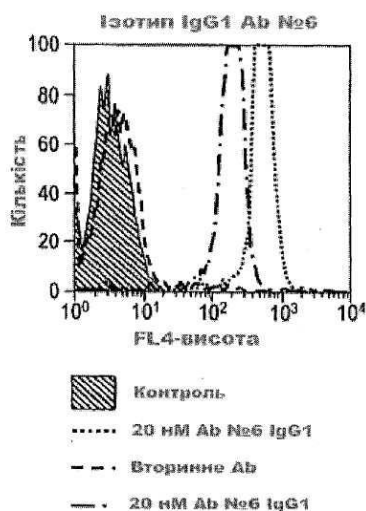
Фіг. 3

Антитіло Ab №6 викликає зниження рівня загального ErbB3 в клітинах меланоми MALME 3M *in vitro* за даними ELISA

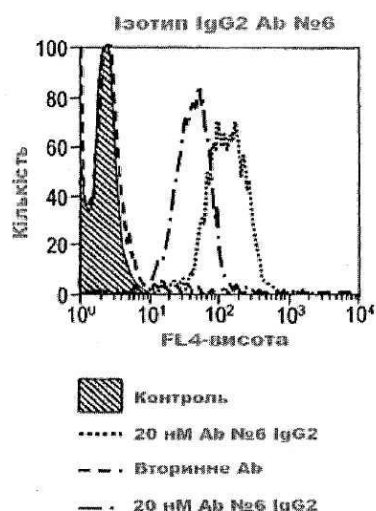


Фіг. 4

Зменшення кількості рецепторів ErbB3 на клітинах меланоми MALME-3М під дією ізотипів IgG1 і IgG2 антитіла Ab №6 за даними аналізу збудженої флуоресценції сортованих клітин (FACS)

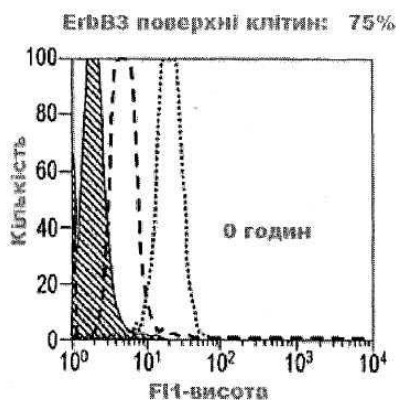


Фіг. 5А

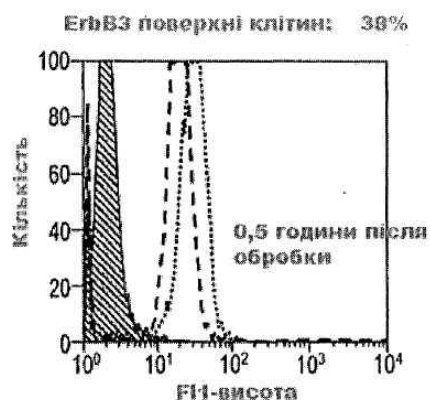


Фіг. 5В

Динаміка опосередкованої антитілом Ab №6 регуляції ErbB3 на пониження

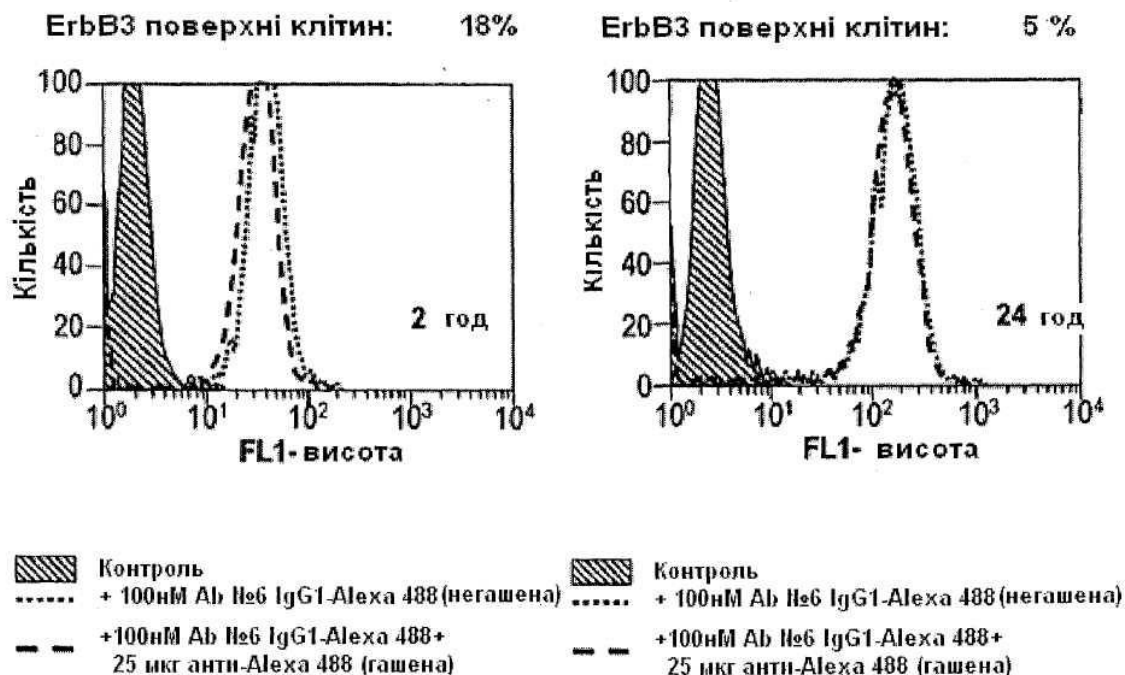


Фіг. 6А



Фіг. 6В

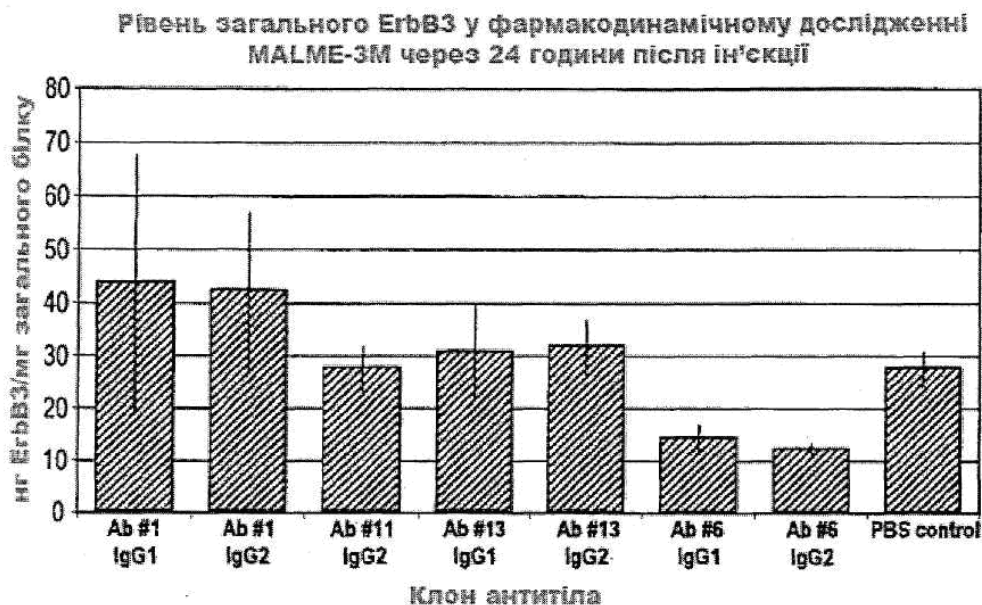
Динаміка опосередкованої антитілом Ab №6 регуляції ErbB3 на пониження



Фіг. 6C

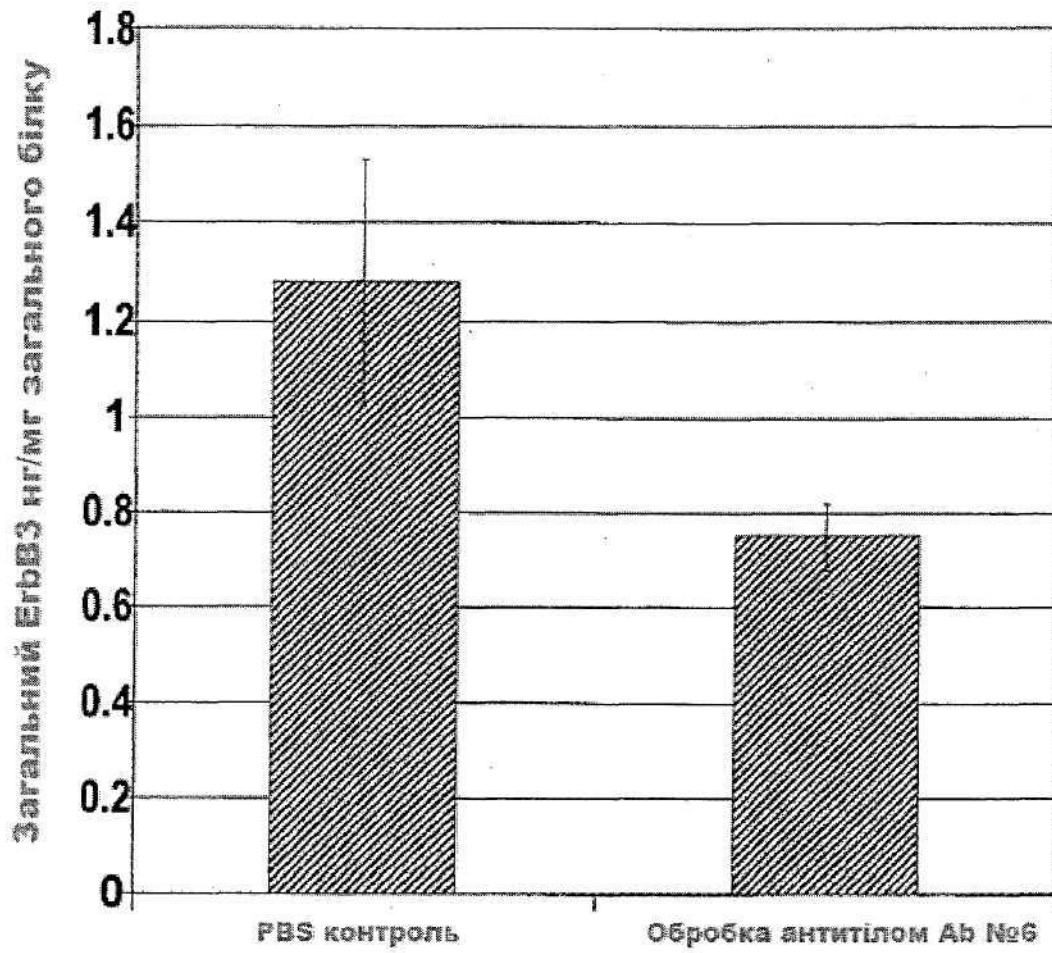
Фіг. 6D

Антитіло Ab №6 викликає регуляцію ErbB3 на пониження  
в клітинах меланоми *in vivo*



Фіг. 7

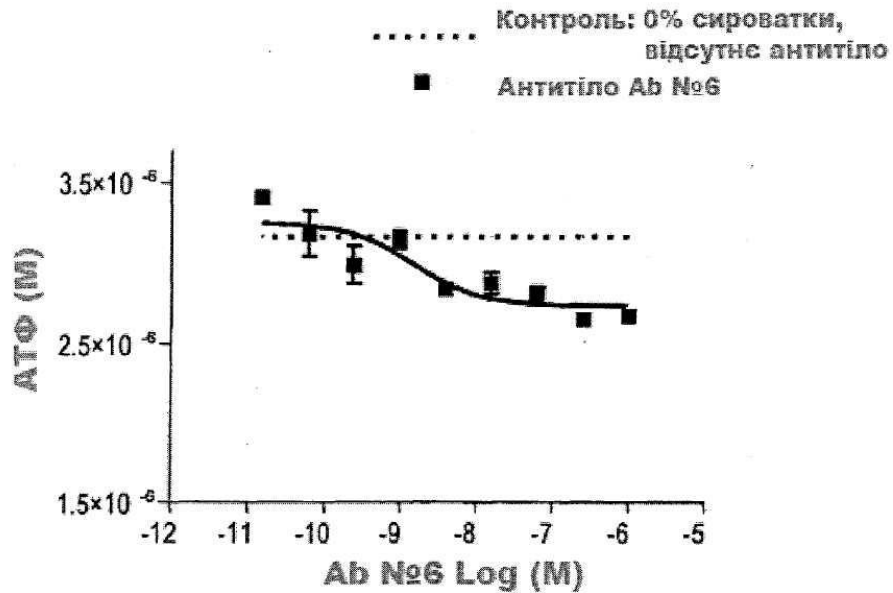
Загальні рівні EгbB3 в ксенотрансплантатах ADRr



Обробка антитілом  
(PBS = забуферений фосфатом сольовий розчин)

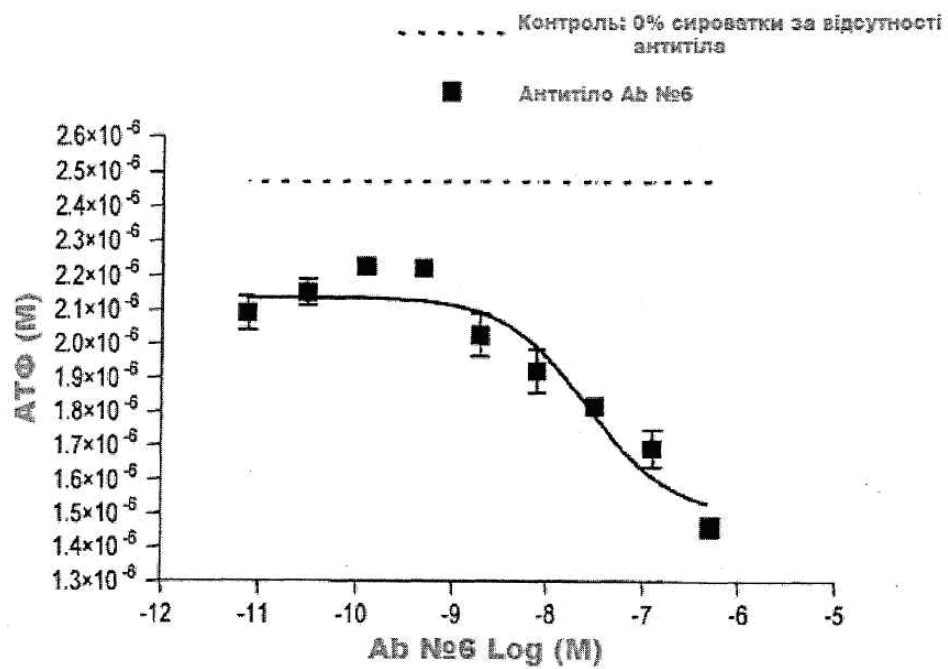
Fig. 8

Антитіло Ab №6 пригнічує проліферацію клітин меланому MALME-3М за даними титрованого світіння клітин (Cell Titer Glow assay)



Фіг. 9

Антитіло Ab №6 пригнічує проліферацію клітин в клітинній лінії ADRr (яєчника)



Фіг. 10

Антитіло Ab №6 пригнічує проліферацію клітин в клітинній лінії ACHN

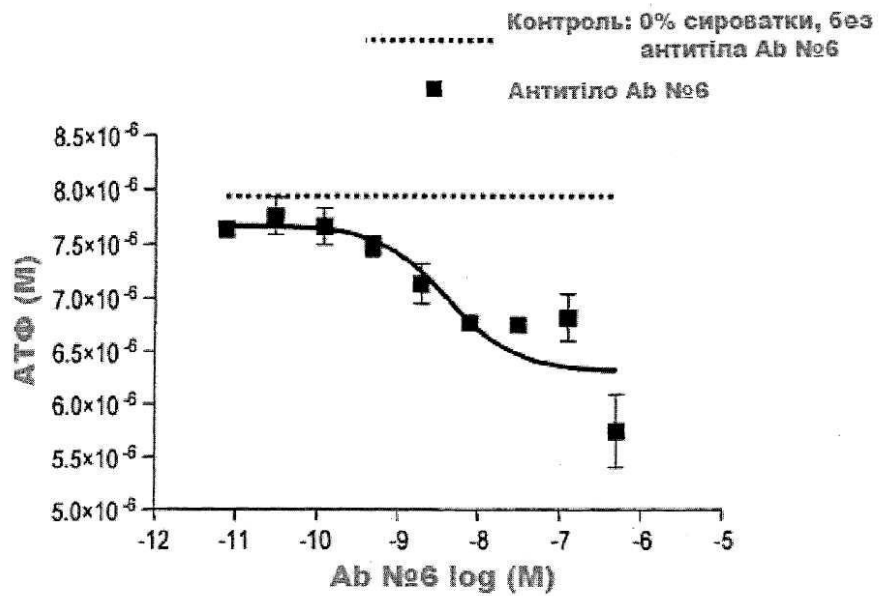


Fig. 11

Антитіло Ab №6 пригнічує фосфорилляцію ErbB3 в ксенотрансплантатах ADRr in vivo

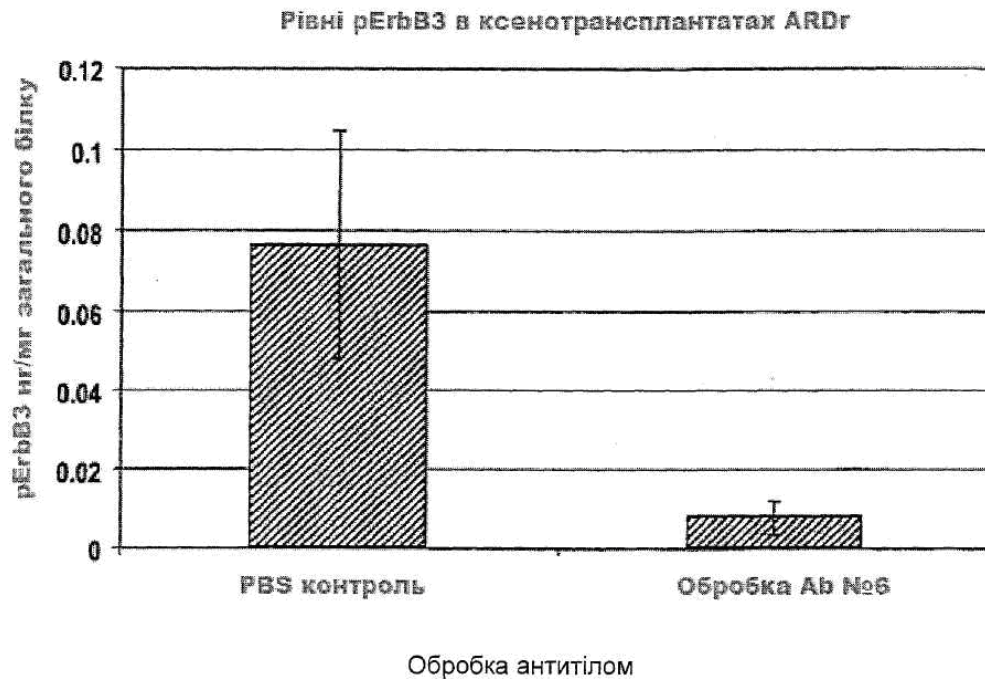


Fig. 12

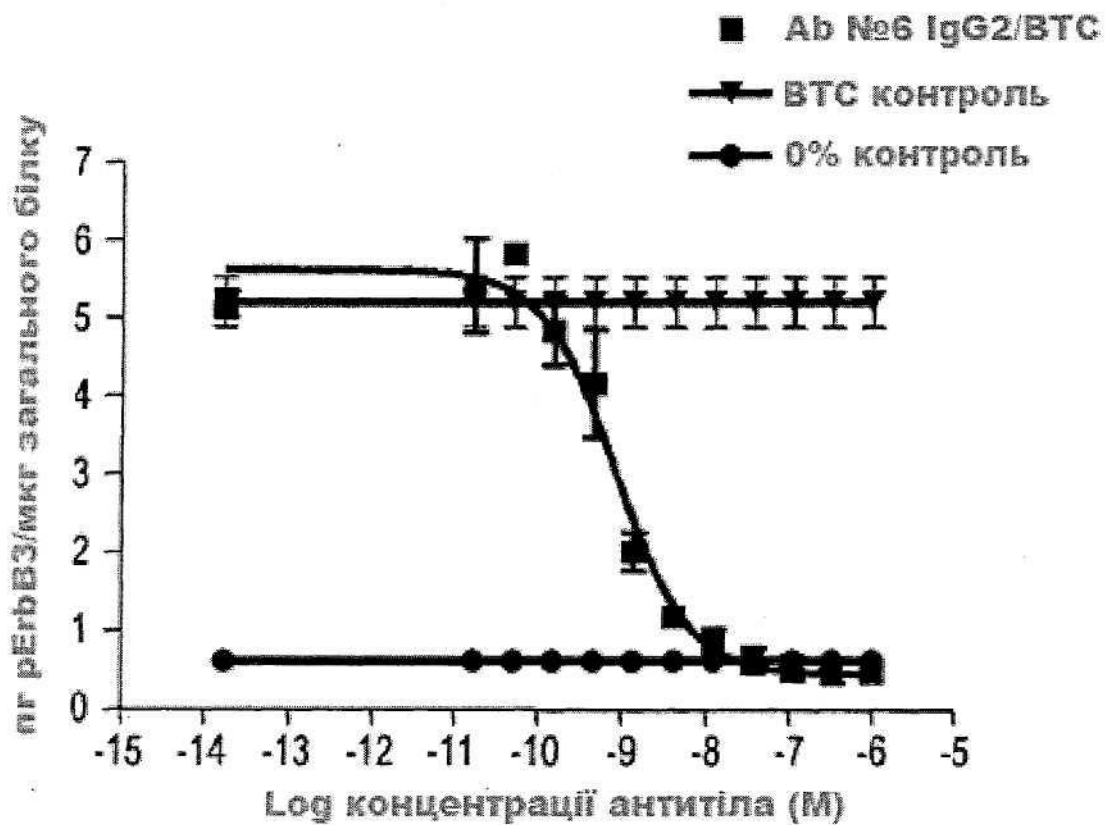
(PBS = забуферений фосфатом сольовий розчин)

## Антитіло Ab №6 IgG2/BTC

IC50 | 8,37e-10 M

95% CI | 5,32e-10 – 1,32e-9

IC50 антитіла Ab №6 в клітинах NCI-ADRr – 0% сироватки



Фіг. 13А

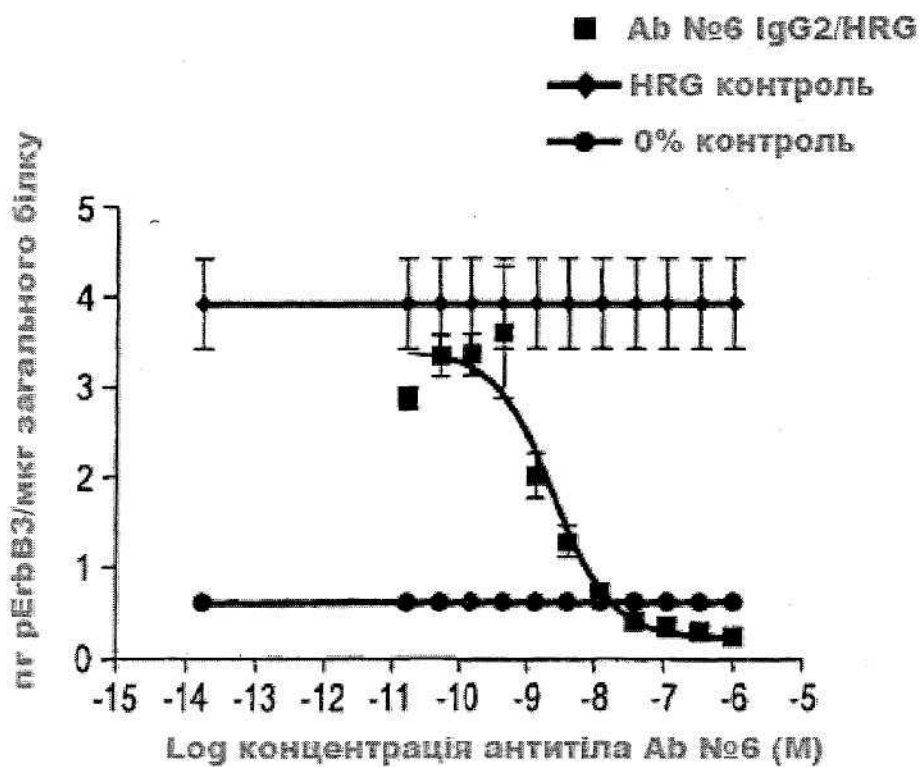


Антитіло Ab №6 IgG2/BTC

IC50 | 2,488e-009

95% CI | 1,051e-009 – 5,889e-009

Ізотип IgG2 антитіла Ab №6 в клітинах NCI-ADPr – 0% сироватки



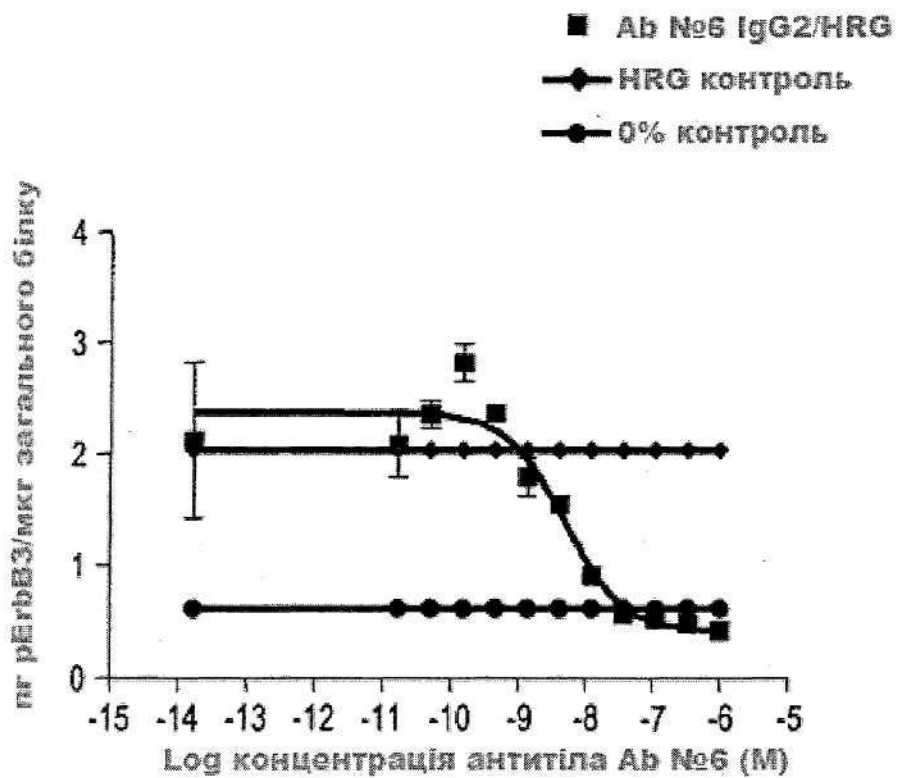
Фіг. 13В

Антитіло Ab №6 IgG2/TGFa

IC50 | 4,901e-009

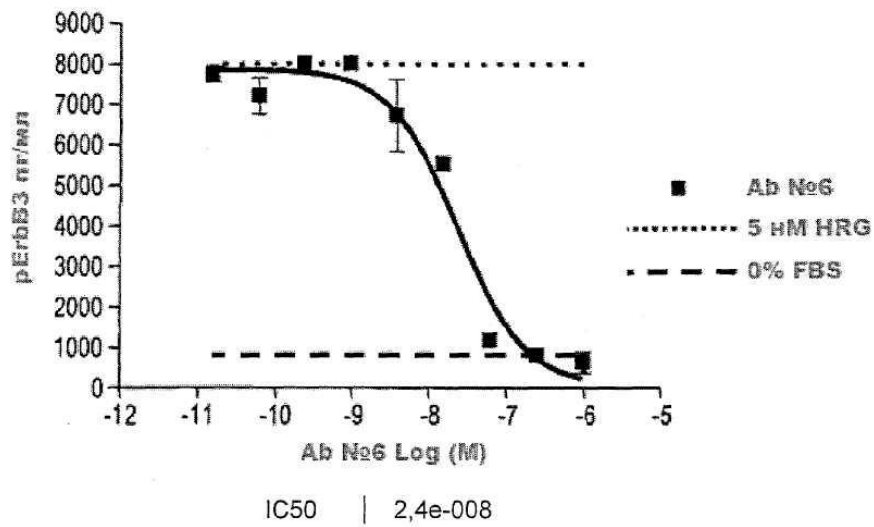
95% CI | 1,965e-009 – 1,222e-008

Ізотип IgG2 антитіла Ab №6 в клітинах NCI-ADDr – 0% сироватки



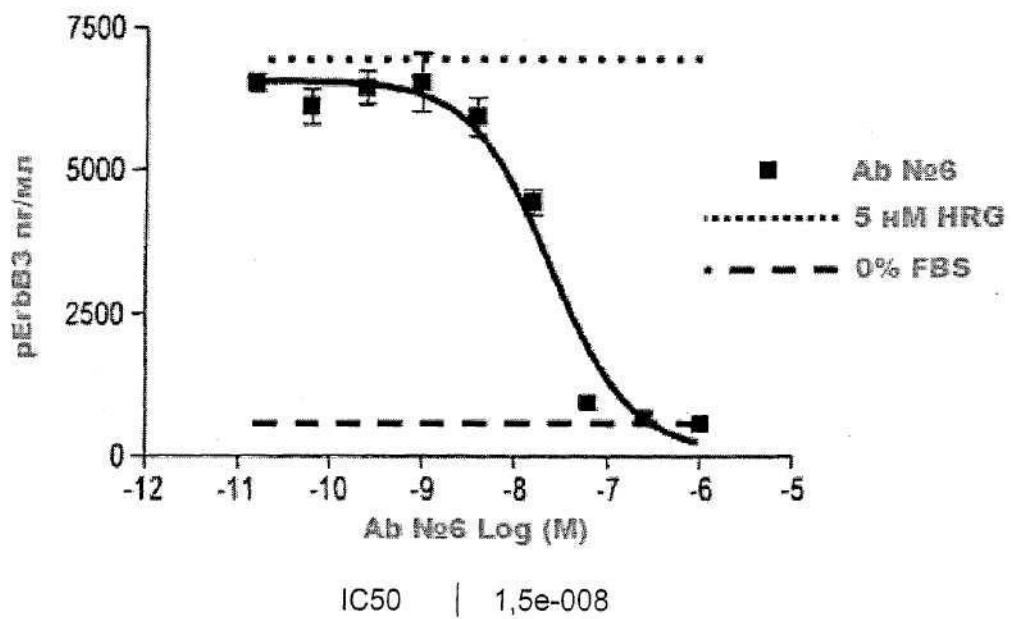
Фіг. 13С

Пригнічення ізотипом IgG2 антитіла Ab №6 фосфориляції ErbB3  
в клітинах OVCAR5



Фіг. 14А

Пригнічення ізотипом IgG2 антитіла Ab №6 фосфориляції ErbB3  
в клітинах OVCAR8



Фіг. 14В

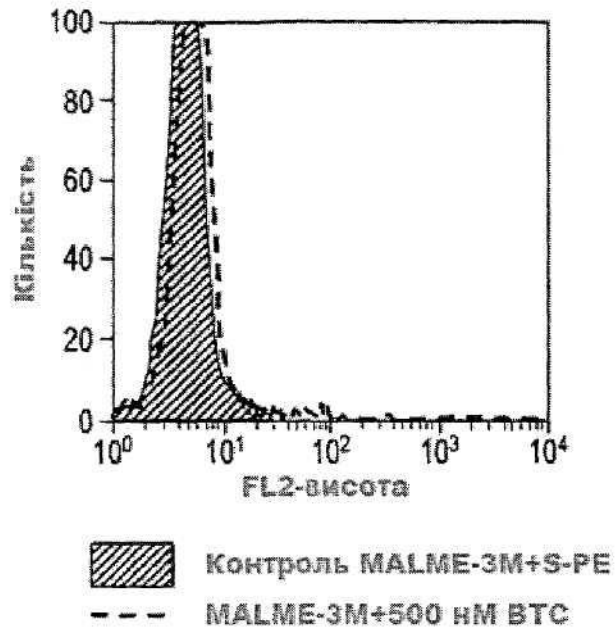


Fig. 15A

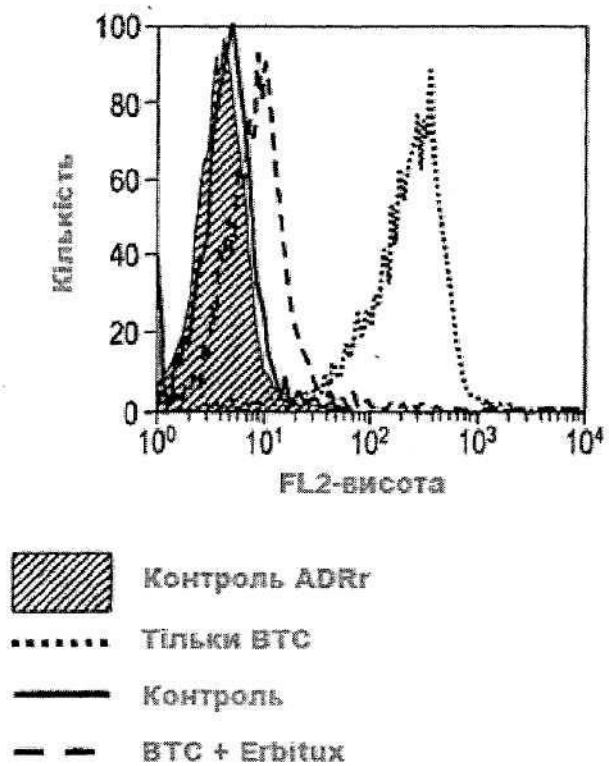
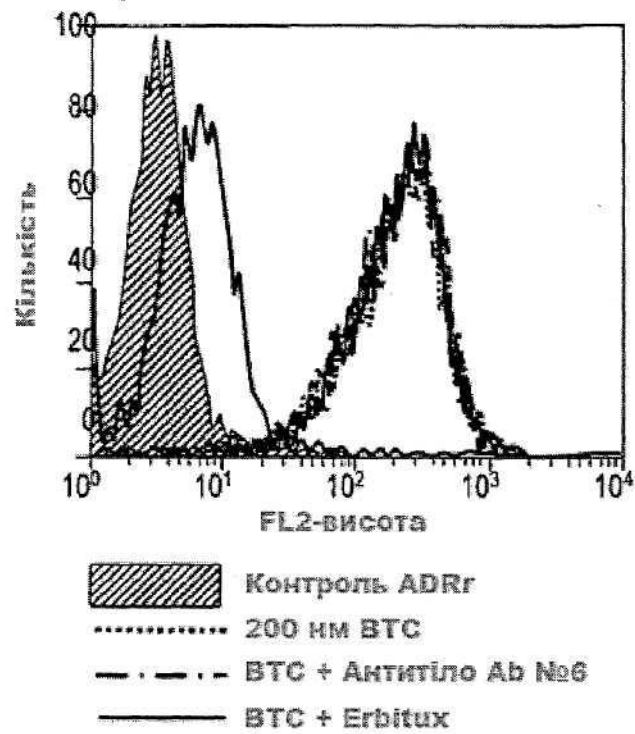


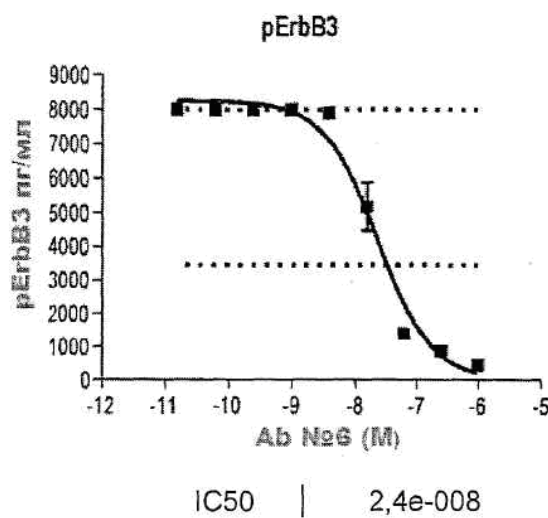
Fig. 15B

Блокування зв'язування BTC Erbitux'ом, але не антитілом Ab №6

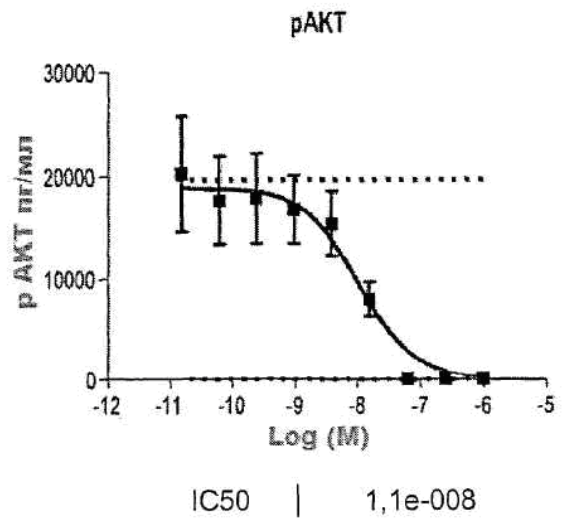


Фіг. 15C

Ізотип IgG2 антитіла Ab №6 пригнічує опосередковане херегуліном проведення сигналів зі схожими IC50 в клітинах MALME-3M

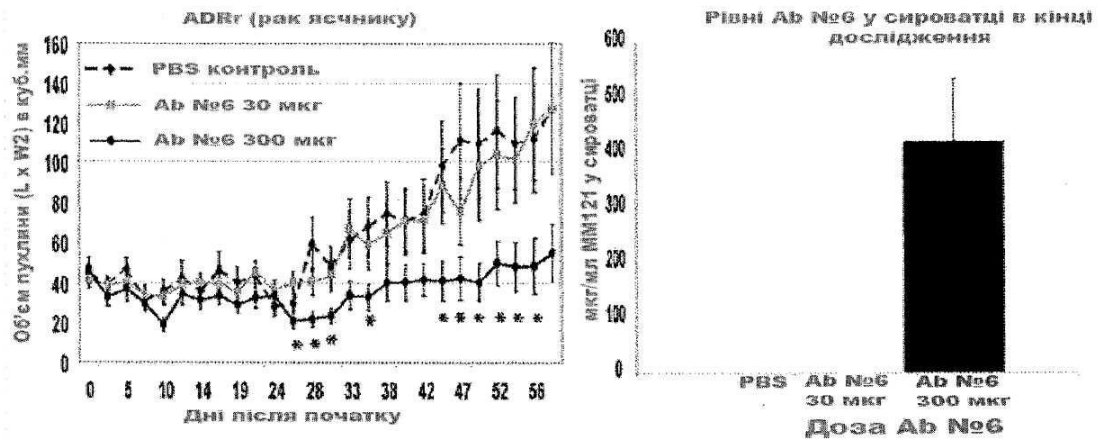


Фіг. 16A



Фіг. 16B

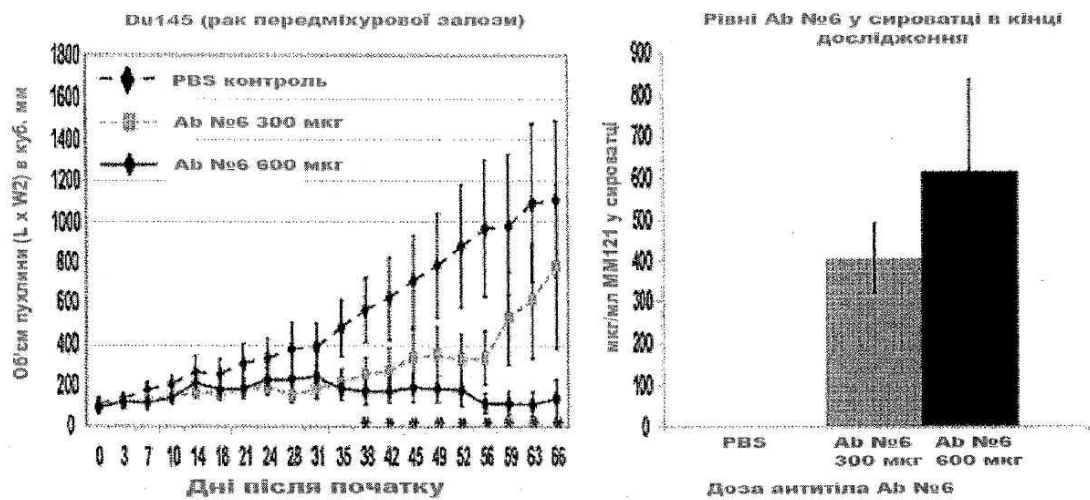
# Пригнічення антитілом Ab №6 росту пухлин



\*P < 0,05

Фіг. 17А

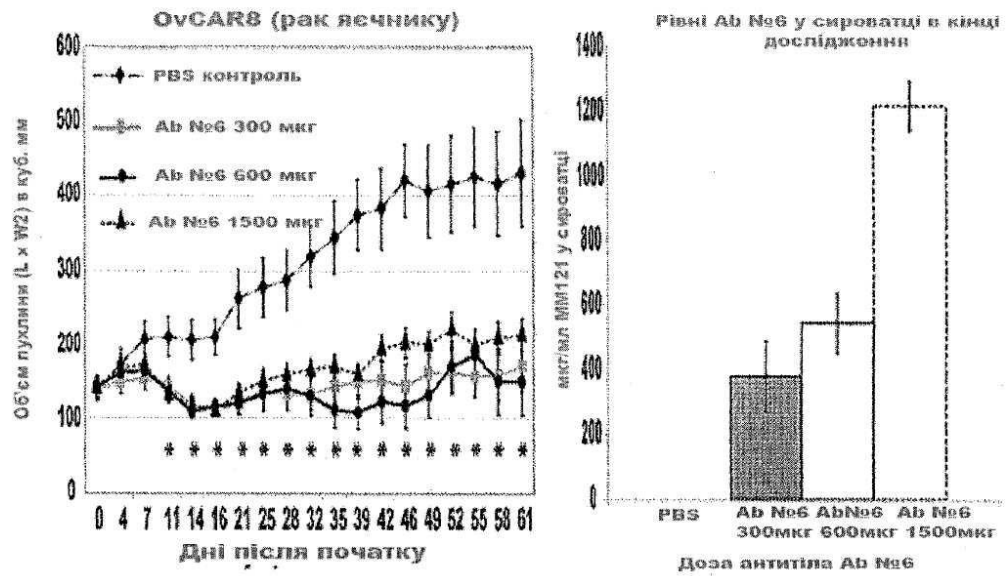
# Пригнічення антитілом Ab №6 росту пухлин



\*P < 0,05

Фіг. 17В

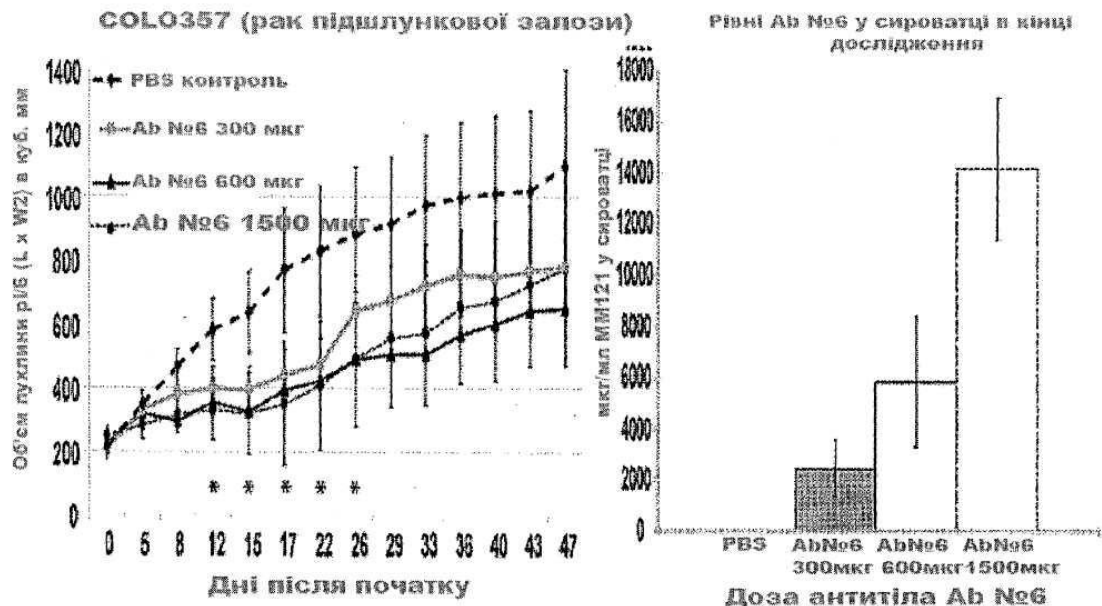
Пригнічення антитілом Ab №6 росту пухлин



\*P < 0,05

Фіг. 17C

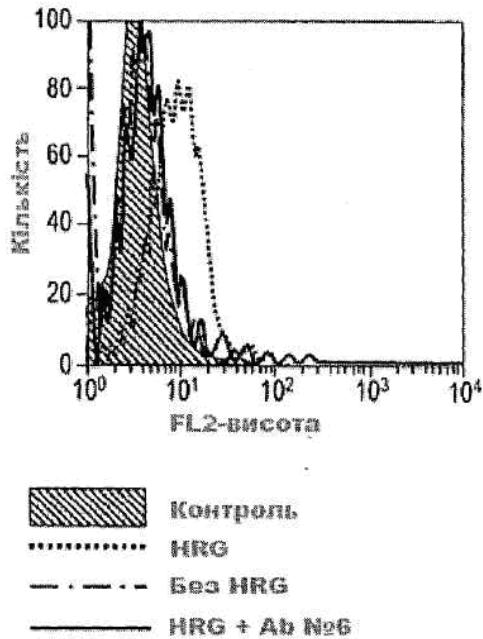
Пригнічення антитілом Ab №6 росту пухлин



\*P<0.05

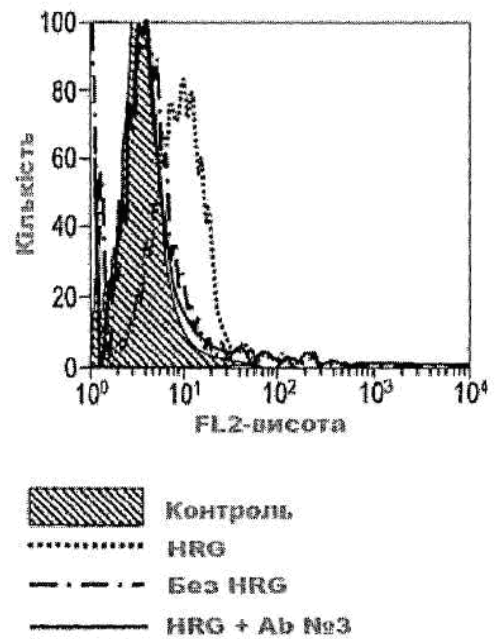
Фіг. 17D

**Блокування антитілом Ab №6  
зв'язування HRG з клітинами  
MALME3**



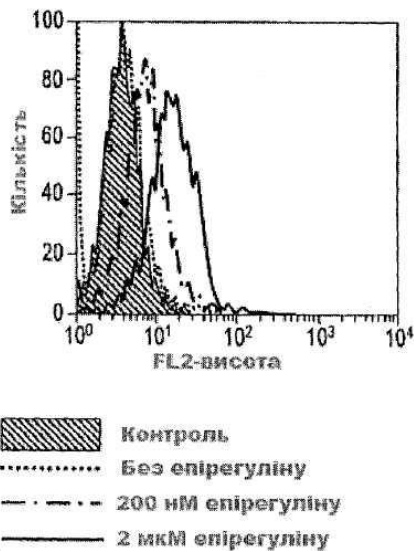
**Фіг.18А**

**Блокування антитілом Ab №3  
зв'язування HRG з клітинами  
MALME3**



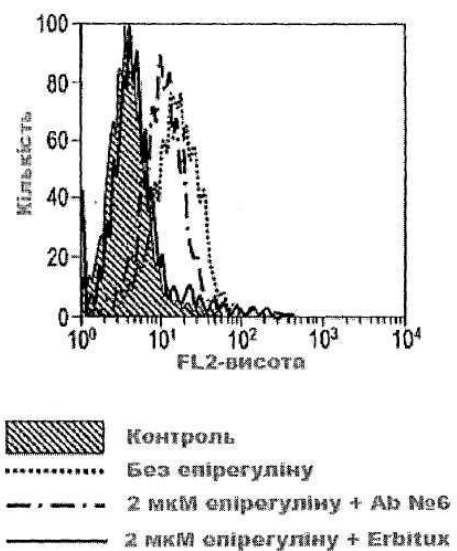
**Фіг. 18В**

**Зв'язування епірегуліну  
з ADRr**



**Фіг.19А**

**Блокування зв'язування епірегуліну  
з ADRr антитілом Ab №6 і Erbitux'ом**



**Фіг. 19В**



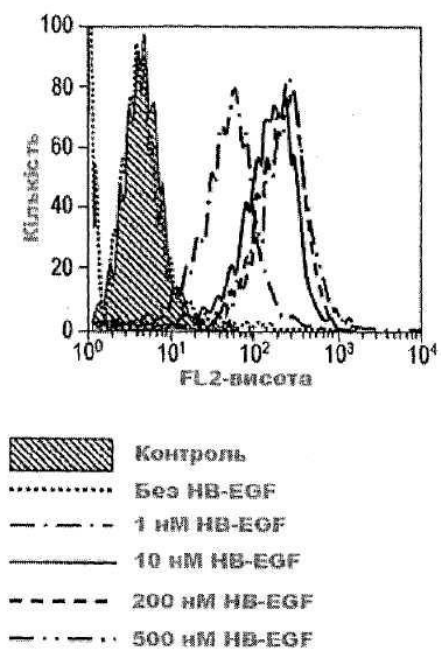


Fig. 20A

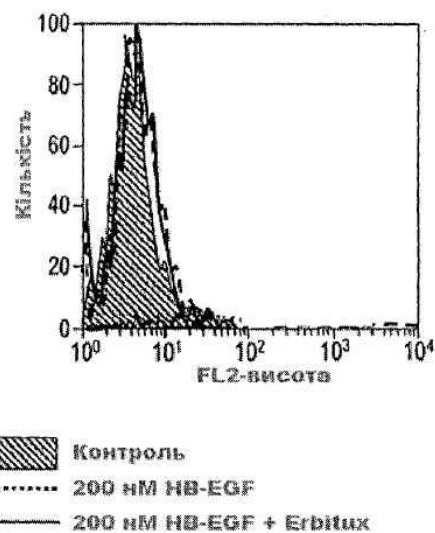


Fig. 20B

Амінокислотна послідовність VH антитіла Ab №6 (SEQ ID №: 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS  
GGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFD  
YWGQGT LVT VSS

Амінокислотна послідовність VL антитіла Ab №6 (SEQ ID №: 2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPKLIIEVSQR  
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTVL

Амінокислотна послідовність VH антитіла Ab №3 (SEQ ID №: 3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPS  
GGATRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDV  
WGQGT LVT VSS

Амінокислотна послідовність VL антитіла Ab №3 (SEQ ID №: 4)

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSDSNIGRNYIYWYQQFPGTAPKLLIYRNNQRP  
SGVPDRISGSKSGTSASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

Амінокислотна послідовність VH антитіла Ab №14 (SEQ ID №: 5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS  
GGHTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLLVD  
AFDIWGQGT MVT VSS

Амінокислотна послідовність VL антитіла Ab №14 (SEQ ID №: 6)

QYELTQPPSVSVYPGQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLVMYKDKRRP  
SEIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSTYVFGTGTKVTVL

Амінокислотна послідовність VH антитіла Ab №17 (SEQ ID №: 35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS  
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDV  
WGQGT TVT VSS

Амінокислотна послідовність VL антитіла Ab №17 (SEQ ID №: 36)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSL N WYQQKPGKAPRLIYDASNLE  
TGVPPRFSGSGSGTDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

Амінокислотна послідовність VH антитіла Ab №19 (SEQ ID №: 37)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWWVRQAPGKGLEWVSYIGSS  
GGPTYVYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDS  
WGQGT LVT VSS

Амінокислотна послідовність VL антитіла Ab №19 (SEQ ID №: 38)

QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVS NR  
FSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTWVFGGGTKLTVL

**Fig. 21A**

Ab №6 VH CDR1 (SEQ ID №: 7)  
HYVMA

Ab №6 VH CDR2 (SEQ ID №: 8)  
SISSSGGWTLYADSVKG

Ab №6 VH CDR3 (SEQ ID №: 9)  
GLKMATIFDY

Ab №6 VL CDR1 (SEQ ID №: 10)  
TGTSSDVGSYNVVS

Ab №6 VL CDR2 (SEQ ID №: 11)  
EVSQRPS

Ab №6 VL CDR3 (SEQ ID №: 12)  
CSYAGSSIFVI

Ab №3 VH CDR1 (SEQ ID №: 13)  
AYNMR

Ab №3 VH CDR2 (SEQ ID №: 14)  
VIYPSGGATRYADSVKG

Ab №3 VH CDR3 (SEQ ID №: 15)  
GYYYYGMDV

Ab №3 VL CDR1 (SEQ ID №: 16)  
SGSDSNIGRNYIY

Ab №3 VL CDR2 (SEQ ID №: 17)  
RNNQRPS

Ab №3 VL CDR3 (SEQ ID №: 18)  
GTWDDSLSGPV

***Фиг. 21B***

Ab № 14 VH CDR1 (SEQ ID №: 19)  
AYGMG

Ab № 14 VH CDR2 (SEQ ID №: 20)  
YISPSGGHTKYADSVKG

Ab № 14 VH CDR3 (SEQ ID №: 21)  
VLETGLLVDAFDI

Ab № 14 VL CDR1 (SEQ ID №: 22)  
SGDQLGSKFVS

Ab № 14 VL CDR2 (SEQ ID №: 23)  
YKDKRRPS

Ab № 14 VL CDR3 (SEQ ID №: 24)  
QAWDSSTYV

Ab № 17 VH CDR1 (SEQ ID №: 39)  
WYGMG

Ab № 17 VH CDR2 (SEQ ID №: 40)  
YISPSGGITVYADSVKG

Ab № 17 VH CDR3 (SEQ ID №: 41)  
LNYYYGLDV

Ab № 17 VL CDR1 (SEQ ID №: 42)  
QASQDIGDSLN

Ab № 17 VL CDR2 (SEQ ID №: 43)  
DASNLET

Ab № 17 VL CDR3 (SEQ ID №: 44)  
QQSANAPFT

Ab № 19 VH CDR1 (SEQ ID №: 45)  
RYGMW

Ab № 19 VH CDR2 (SEQ ID №: 46)  
YIGSSGGPTYVDSVKG

Ab № 19 VH CDR3 (SEQ ID №: 47)  
GRGTPYYFDS

Ab № 19 VL CDR1 (SEQ ID №: 48)  
TGTSSDIGRWNIVS

Ab № 19 VL CDR2 (SEQ ID №: 49)  
DVSNRPS

Ab № 19 VL CDR3 (SEQ ID №: 50)  
SSYTSSSTWV

**Фиг. 21C**

Ab № 6 VH, оптимізована послідовність нуклеїнових кислот кодону (SEQ ID №: 25)

gagggtgcagctgctggagagcggcgagggtggtccagccaggcgagcctgaggctgtcctgcgccgccagcggttcac  
cttcagccactactgtgatggcctgggtgcggcaggccccaggcgaagggtctggaatgggtgtccagcatcagcagcagcggtgg  
ctggacctgtacgccgacagcgtgaagggtcagggttcaccatcagcagggaacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaac  
agcctgagggtccgaggacaccgcccgtgtactactgcaccagggtgctgaagatggccaccatcttcgactactggggccagggtc  
acctggtgacctgagcagc

Ab № 6 VL, оптимізована послідовність нуклеїнових кислот кодону (SEQ ID №: 26)

cagtcggccctgagccagccccgagcgtgagcggcagccaggccagagcatcaccatcagctgcaccggcaccagcagcgga  
cgtgggcagctacaacgtgggtgtcctgggtatcagcagcaccggcgaaggcccccaagctgatcatctacgaggtgtccagagg  
cccagcggcgtgagcaacaggttcagcggcagcaagagcgggaacaccgccagcctgacctcagcggcctgcagaccgagg  
acgaggccgactactactgtctgcagctacgccggcagcagcatcttcgtgatcttcggcgagggtgaccaaggtgacctccta

Ab № 3 VH, оптимізована послідовність нуклеїнових кислот кодону (SEQ ID №: 27)

gagggtgcagctgctggaaagcggcgagggtggtgcagccaggcgagcctgaggctgtcctgcgccgccagcggttcac  
cttcagcgcctacaacatgagatgggtgcggcaggccccaggcgaagggtcctggaatgggtgtcctgtatctacccagcggtgg  
agccaccagatacggcagcgtgaagggtcagggttcaccatcagcagggaacaacagcaagaacacctgtacctgcagatgaa  
cagcctgagggtccgaggacaccgcccgtgtactactgcggccagggtgctactactactacggcatggacgtgtggggccagggtcac  
cctggtgacctgagcagc

Ab № 3 VL, оптимізована послідовність нуклеїнових кислот кодону (SEQ ID №: 28)

cagagcgtgtgacctagcccccaagcgccagcggcaccgccaggccagagggtgacctcagctgcagcggcagcgacagca  
acatcggcagggaactacatctactggtatcagcagttccccggcaccgcccccaagctgtgatctacagggaacaacagagggtcc  
agcggcgtgcccagaggtatcagcggcagcaagagcggcaccagcgccagcctggccatcagcggcctgagaagcagggtac  
gaggccgagtaccactgcggcacctgggacgacagcctgagcggccaggtgtcggcgagggtgaccaagctgacctccta

**Fig. 22A**

Ab № 14 VH, послідовність нуклеїнових кислот (SEQ ID №: 29)

gaagttcaattgttagagtctggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttcttgcgctgcttccggattcactttctct  
gcttacggtatgggttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggtttcttatctctcttctggtggccataactaag  
tatgctgactccgttaaagggtcgttcaactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcagatgaacagcttaagggc  
tgaggacacggcgtatattactgtgcgaaagtactggaaactggcttattggtgatgcttttgatatctggggccaagggaca  
atggtcaccgtctcaagc

Ab № 14 VL, послідовність нуклеїнових кислот (SEQ ID №: 30)

cagtacgaattgactcagccaccctcagtgtccgtgtaccaggacagacagccagcatcacctgctctggagatcaattggg  
gagtaaattgttccctggatcagcagaggccaggccagtcctcctgtgttggcatgtataaagataaaaggcggccgtcaga  
gatccctgagcgttctctggctccaactctgggaacacagccactctgacctcagcgggaccaggctatagatgaggct  
gactattattgtcaggcgtgggacagcagcactatgtcttcggcactgggaccaagggtcaccgtccta

Ab № 6 VH, послідовність нуклеїнових кислот до оптимізації (SEQ ID №: 31)

gaagttcaattgttagagtctggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttcttgcgctgcttccggattcactttctct  
cattacgttatggcttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggtttcttatctcttcttctggtggctggactctttat  
gctgactccgttaaagggtcgttcaactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcagatgaacagcttaagggctg  
aggacacagccgtgtattactgtactagaggtctcaagatggctacaattttgactactggggccagggcaccctggtcaccg  
tctcaagc

Ab № 6 VL, послідовність нуклеїнових кислот до оптимізації (SEQ ID №: 32)

cagagcgtttgactcagccctgcctccgtgtctgggtctcctggacagtcgatcaccatctcctgcactggaaccagcagtgat  
gttgggagtataatgttgtctcctggtaaccaacaacaccaggcacaagcccccaactcatcttattgaggtcagtcagcgg  
ccctcaggggtttctaactcgttctctggctccaagcttggaacacggcctccctgacaatctctgggtccagactgaggac  
gaggctgattactgtctcctatgcaggtagtagtattttctgatattcggcggagggaaccaagggtaccgtccta

Ab № 3 VH, послідовність нуклеїнових кислот до оптимізації (SEQ ID №: 33)

gaagttcaattgttagagtctggtggcggtctgttcagcctgggtggtctttacgtctttcttgcgctgcttccggattcactttctct  
gcttacaatatgcgttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggtttctgttatctatccttctggtggcgtactcgtt  
atgctgactccgttaaagggtcgttcaactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcagatgaacagcttaagggct  
gaggacacggcgtgtattactgtgcgagagggtactactactacgggtatggacgtctggggccaaggcaccctggtcaccg  
tctcaagc

Ab № 3 VL, послідовність нуклеїнових кислот до оптимізації (SEQ ID №: 34)

cagagcgtttgactcagccaccctcagcgtctgggaaccccgggcagagggtcaccatctcgtgttctggaagcgactcca  
acatcggaagaaattatatattggtaccagcaattccaggaacggcccccaagctcctcatctataggaataatcagcggc  
cctcaggggtccctgaccgaatctctggctccaagctctggcacctcagcctccctggccatcagtggttccgggtccgaggat  
gaggctgagtatcactgtggaacatgggatgacagcctgagtggtccggtattcggcggagggactaagctgaccgtccta

**Fig. 22B**

Ab №6 VLb:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSQYQHPGKAPK  
LMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYA  
GSSIFVIFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:51)

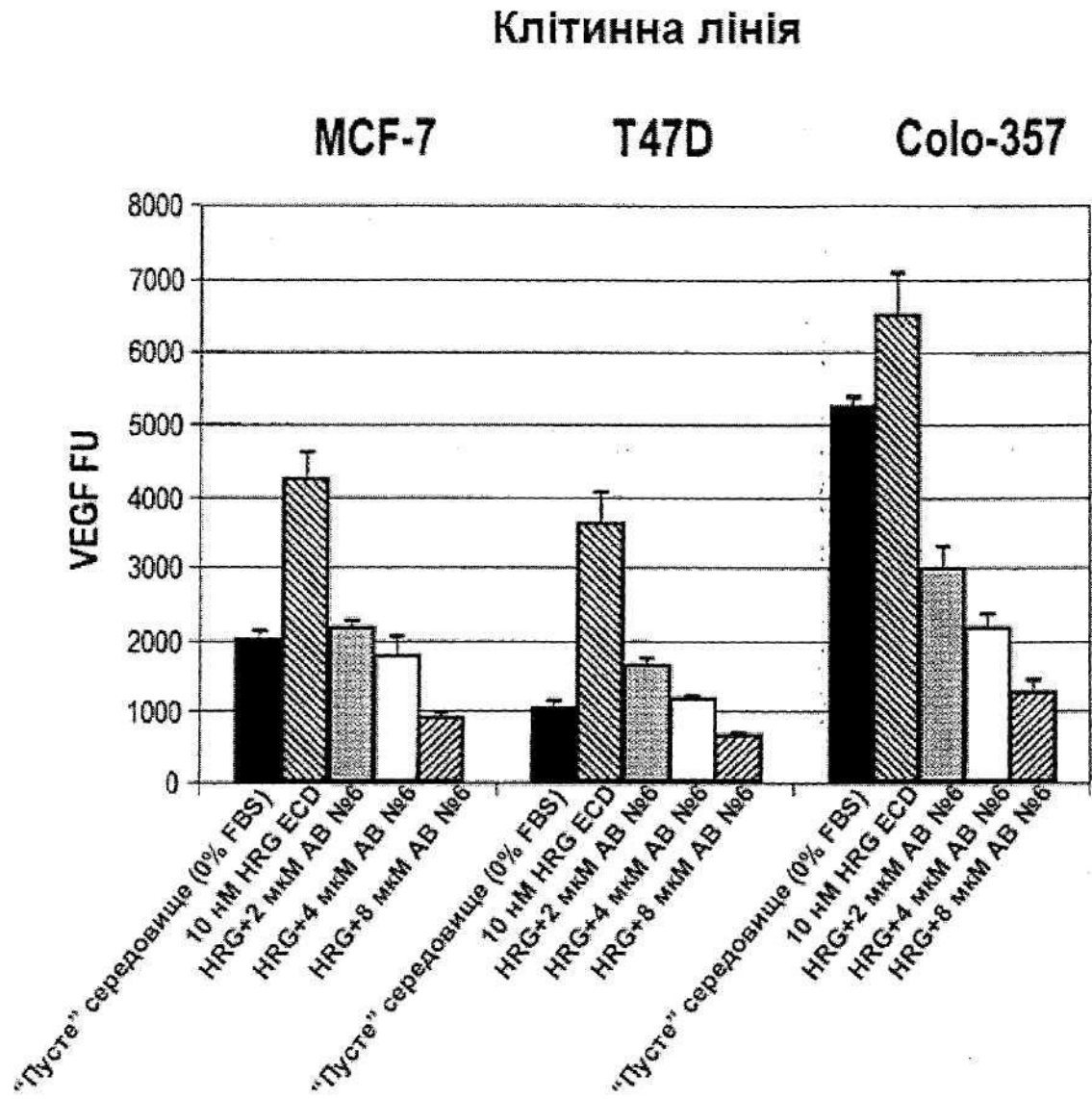
Ab №17 VK1b:

QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSLQWYQKPGKAPRL  
IYDASNLETGVPPRFSGSGSGTDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAP  
FTFGPGTKVDIR (SEQ ID NO:52)

Ab №19 VL2b:

QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQHPGKAPK  
LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTS  
SSTVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:53)

*Fig. 23*



**Обробка**

**Фіг. 24А**



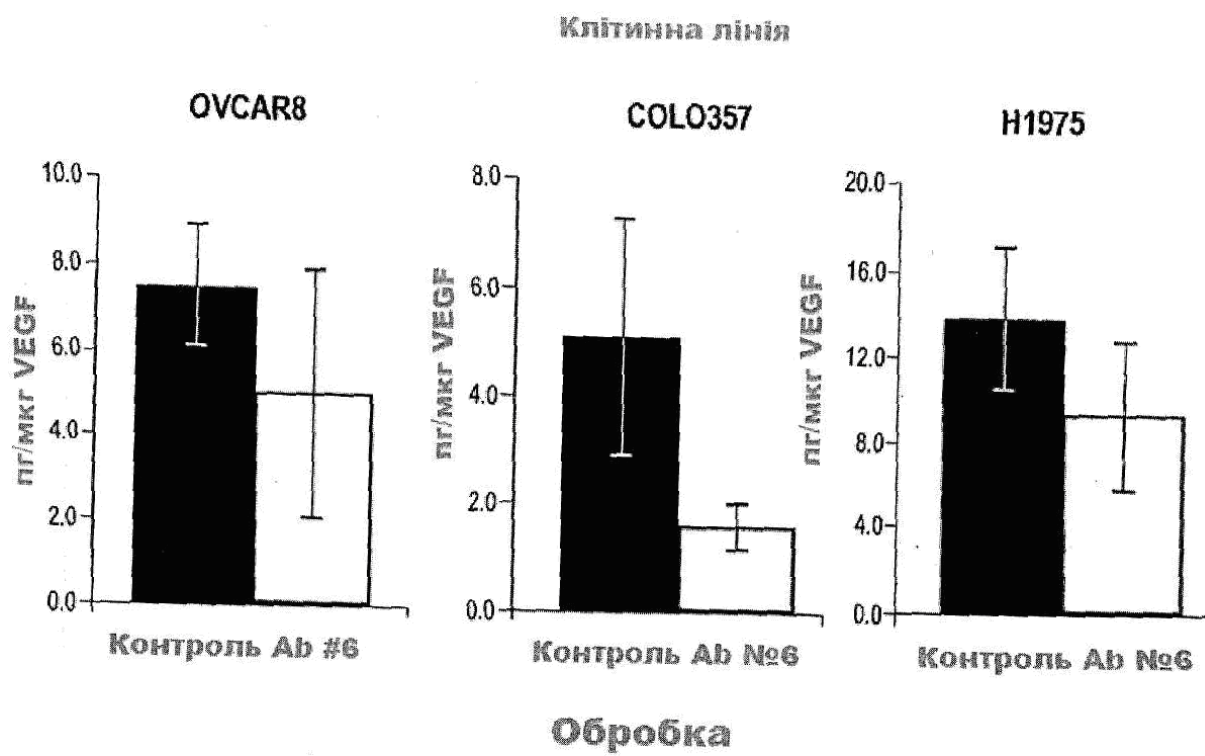
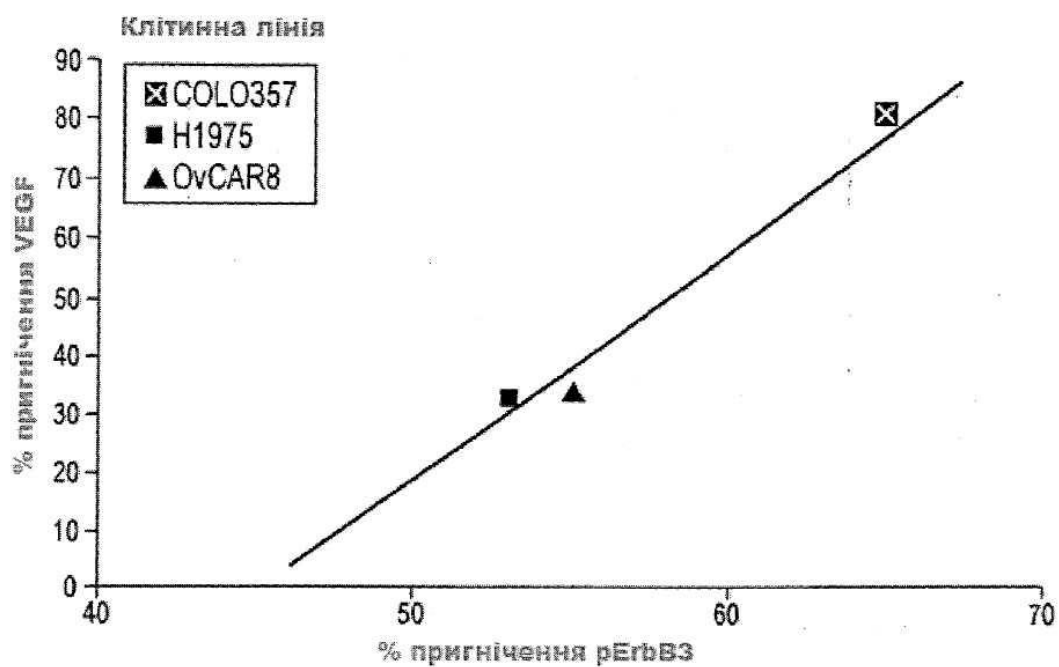


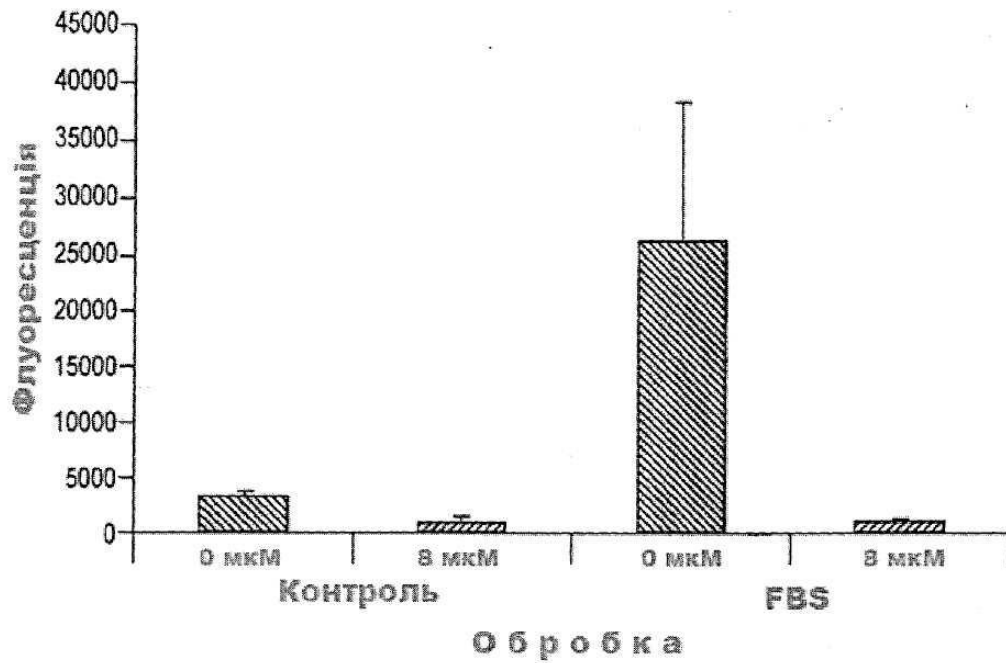
Fig. 24B

Кореляція між пригніченням фосфорилляції ErbB3 та  
пригніченням секреції VEGF



Фіг. 24С

### Вплив антитіла Ab №6 на міграцію клітин



Тільки середовище RPMI  
 Середовище RPMI + 8 мкМ антитіла Ab №6  
 Середовище RPMI + 10% FBS  
 10% FBS + 8 мкМ антитіла Ab №6

Fig. 25

### Пригнічення росту сфероїдів антитілом Ab №6 в клітинах ADRr

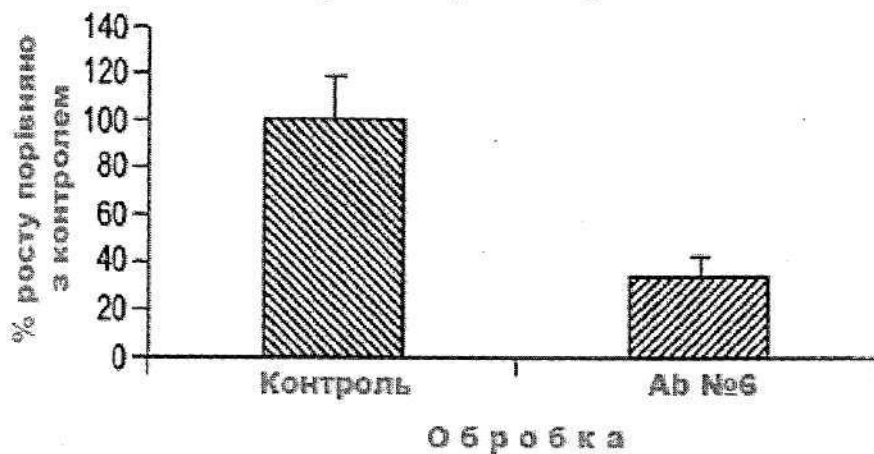
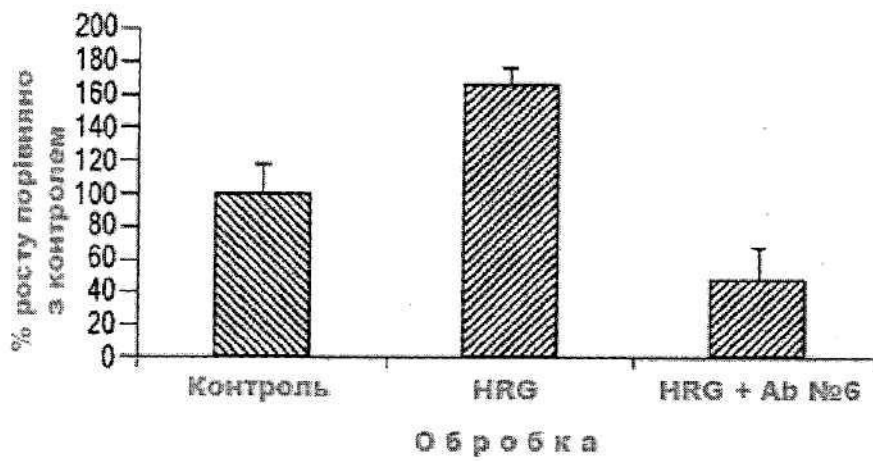


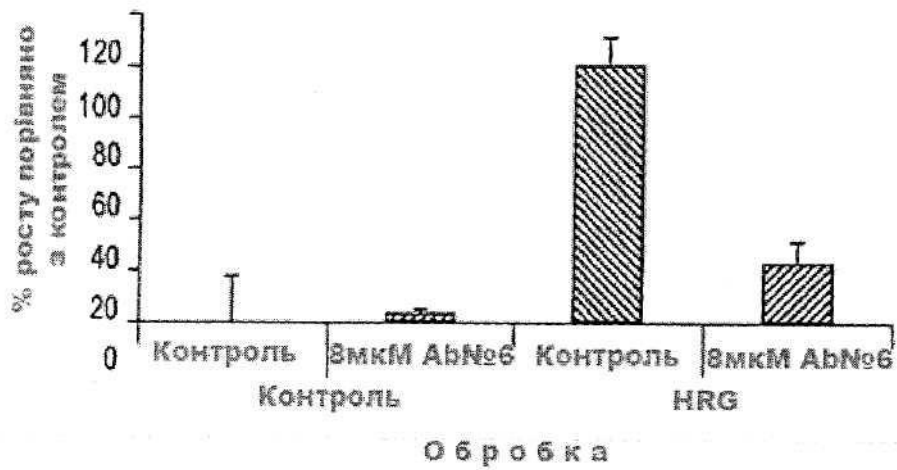
Fig. 26A

Пригнічення індукованого HRG росту сфероїдів в клітинах ADRr



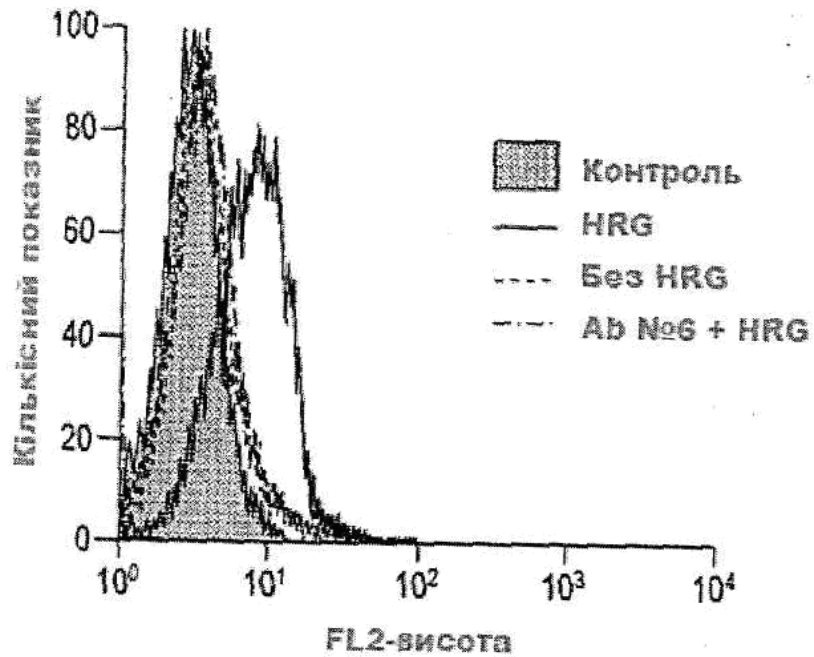
Фіг. 26В

Пригнічення індукованого HRG росту сфероїдів в клітинах Du 145



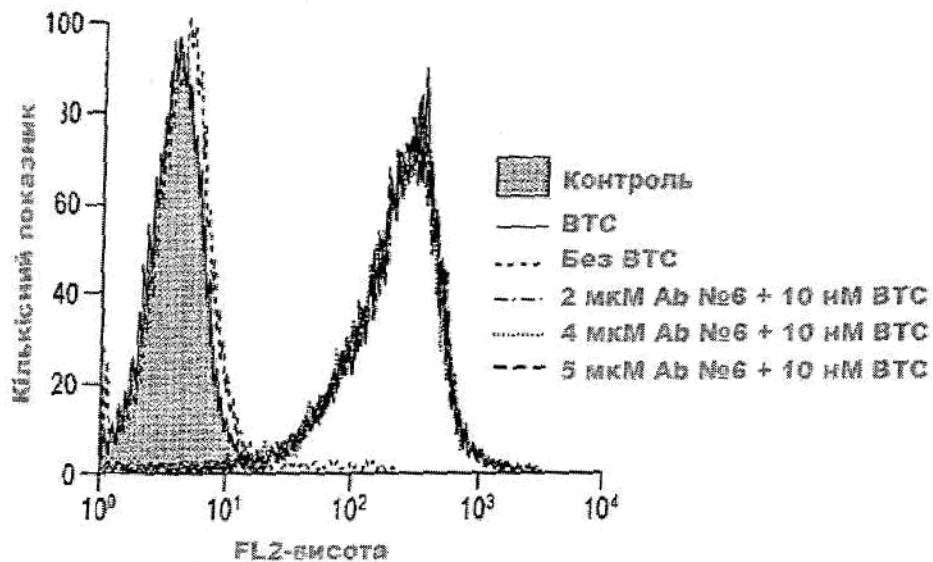
Фіг. 26С

Вплив антитіла Ab №6 на зв'язування HRG з клітинами ADRr



Фіг. 27А

Вплив антитіла Ab №6 на зв'язування BTC з клітинами ADRr



Фіг. 27В

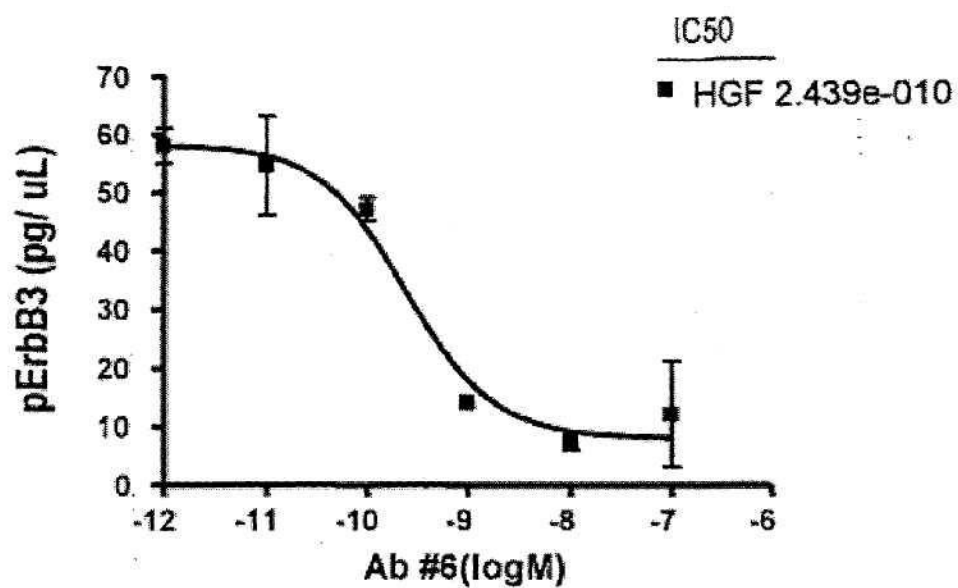


Fig. 28

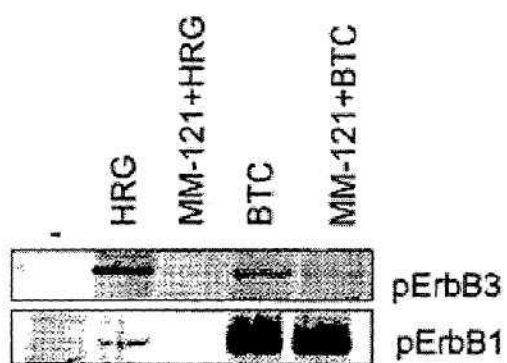


Fig. 29A

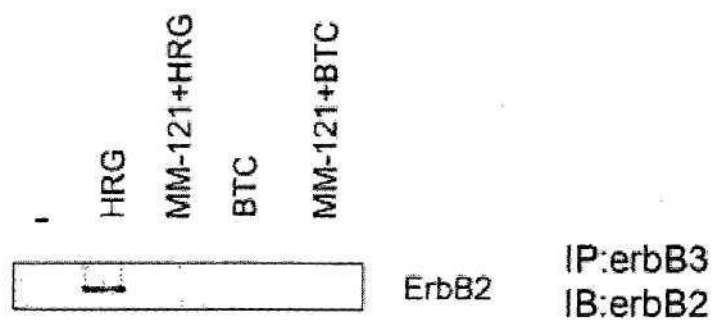


Fig. 29B

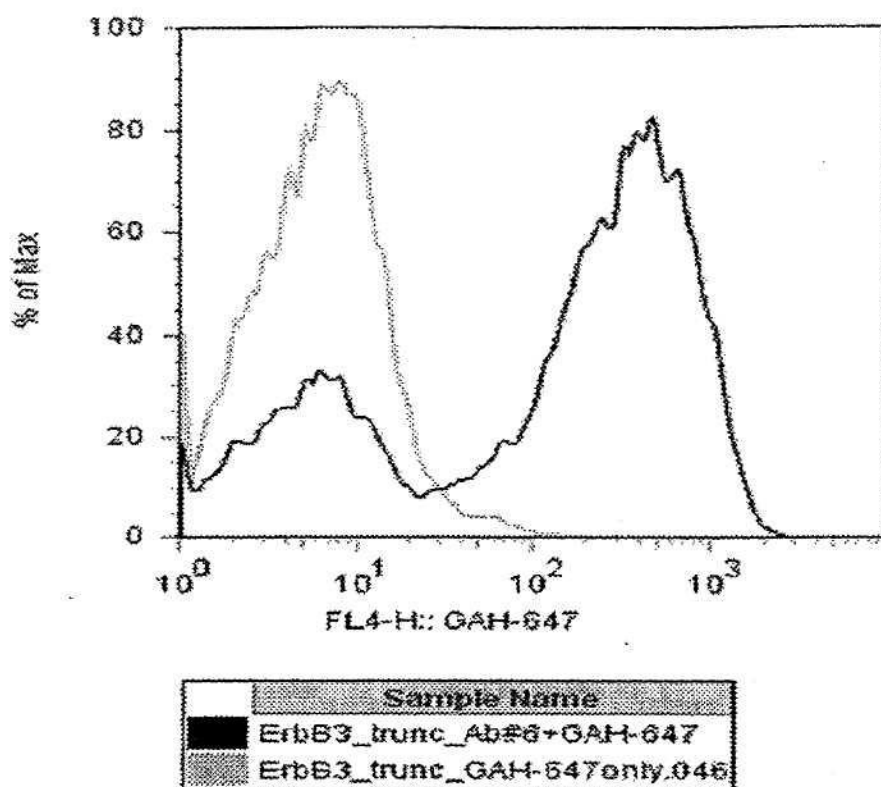


Fig. 30

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601