



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115985** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)

A61K 31/663 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 13807	(72) Винахідник(и): Сахін Угур (DE), Тюречі Езлем (DE), Мітнахт-Краус Ріта (DE), Якобс Штефан Деніс (DE), Уч Магдалена Ядвіґа (DE), Хайнц Корнелія Адріана Марія (DE), Штадлер Крістіане Регіна (DE)
(22) Дата подання заявки: 21.05.2013	(73) Власник(и): ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ, An der Goldgrube 12, 55131 Mainz, Germany (DE), ТРОН - ТРАНСЛАЦІОНАЛЕ ОНКОЛОГІ АН ДЕР ЙОХАННЕС ГУТЕНБЕРГ-УНІВЕРЗІТЕТ МАЙНЦ ГЕМАЙННЮТЦІГЕ ГМБХ, Langenbeckstrasse 1, 55131 Mainz, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.01.2018	(74) Представник: Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: PCT/EP2012/002211	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010/141093 A2, 09.12.2010 WO 2007/059997 A1, 31.05.2007 WO 2008/152822 A1, 18.12.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 23.05.2012	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: EP	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2015, Бюл.№ 12	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2018, Бюл.№ 2	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2013/001503, 21.05.2013	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АБО ЗАПОБІГАННЯ РАКУ ШЛУНКА

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування або запобігання раку шлунку, що характеризується злоякісними пухлинними клітинами, експресуючими CLDN18.2, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, в комбінованій терапії із засобом, який стимулює γδ Т-клітини, де

(a) антитіло, яке зв'язує CLDN18.2 являє антитіло, здатне опосередкувати знищення клітин, експресуючих CLDN18.2 за допомогою антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (ADCC), опосередковуючої лізис, де антитіло включає важкий ланцюг антитіла, що включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:32 та легкий ланцюг антитіла, що включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:39; і

(b) агент, стимулюючий γδ Т-клітини, являє собою бісфосфонат, і де бісфосфонат вводять пацієнтові в комбінованій терапії з інтерлейкіном-2.

UA 115985 C2

Раки шлунка й стравоходу (гастроезофагеальні раки; GE) належать до злоякісних новоутворень, з якими пов'язана найвища нереалізована потреба медицини. Рак шлунка посідає друге місце серед причин смерті від раку в усьому світі. Частота випадків виникнення езофагеального раку збільшилася за останні десятиліття, збігаючись зі зміною гістологічного типу й первинної локалізації пухлини. У цей час аденокарцинома стравоходу є більш поширеною в Сполучених штатах і Західній Європі, ніж плоскоклітинна карцинома, при цьому більшість пухлин знаходяться в дистальному стравоході. Рівень загального 5-літнього виживання для GE раку становить 20-25 %, незважаючи на агресивність установленого стандартного лікування, пов'язаного з істотними побічними ефектами.

У більшості пацієнтів виявляється місцеворозташована або метастазуюча пухлина, після чого вони проходять першу серію хіміотерапії. Режими лікування, засновані на комбінації платини й похідних фторпіримідину, звичайно комбінують із третьою сполукою (наприклад, таксаном або антрациклінами). Однак, медіана виживання без прогресування від 5 до 7 місяців і медіана загального виживання від 9 до 11 місяців – це найкраще, чого можна чекати.

Відсутність істотної користі від різних режимів комбінованої хіміотерапії нового покоління щодо цих видів раку стимулювала дослідження, пов'язані з використанням таргентних (націлених на мішені) препаратів. Останнім часом для лікування Her2/neu-позитивних гастроезофагеальних видів раку був схвалений трастузумаб. Однак, даний вид лікування придатний тільки для ~20 % пацієнтів, у яких експресується дана мішень, тому потреба медицини в препаратах залишається як і раніше високою.

Молекула щільних контактів клаудин 18 сплайс-варіант 2 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)) є членом родини білків клаудину – білків щільних контактів. CLDN18.2 є трансмембранним білком (27.8 кДа), який містить чотири трансмембранні домени із двома невеликими позаклітинними петлями.

У нормальних тканинах, за винятком шлунка, відсутня експресія CLDN18.2, яку б можна було б зафіксувати за допомогою RT-PCR. Проведення імуногістохімічного аналізу за допомогою CLDN18.2-специфічних антитіл показує, що шлунок є єдиною позитивною за цим білком тканиною.

CLDN18.2 є високоселективним гастральним антигеном, експресованим винятково на короткоживучих диференційованих епітеліальних клітинах шлунка. CLDN18.2 зберігається в ході злоякісної трансформації, і тому часто виявляється на поверхні клітин раку шлунка людини. Більше того, цей панпухлинний антиген ектопічно активований на значимих рівнях в аденокарциномах стравоходу, підшлункової залози й легенів. Білок CLDN18.2 також локалізується в метастазах аденокарциноми шлунка в лімфатичних вузлах і у віддалених метастазах, зокрема, у яєчниках (так звана пухлина Крукенберга).

Химерне IgG1 антитіло IMAB362, спрямоване проти CLDN18.2, було розроблене компанією Ganymed Pharmaceuticals AG. IMAB362 розпізнає перший позаклітинний домен (ECD1) CLDN18.2 з високою афінністю й специфічністю. IMAB362 не зв'язується з будь-яким іншим членом родини клаудинів, включаючи близькоспоріднений сплайс-варіант 1 клаудину 18 (CLDN18.1). IMAB362 демонструє вузьку специфічність до пухлинних клітин і поєднує в собі чотири незалежні високоактивні механізми дії. Після зв'язування з мішенню IMAB362 опосередковує знищення клітин за допомогою ADCC, CDC та індукції апоптозу, спричиненого перехресним зв'язуванням мішені на поверхні пухлинної клітини, і прямого інгібування проліферації. Таким чином, IMAB362 ефективно викликає лізис CLDN18.2-позитивних клітин, включаючи лінію клітин раку шлунка людини *in vitro* і *in vivo*. У мишей, які несуть CLDN18.2-позитивну лінію клітин раку, спостерігається позитивний вплив на виживання, і аж до 40 % мишей демонструє регресію пухлини при лікуванні IMAB362.

Токсичність і PK/TK профіль IMAB362 були ретельно досліджені на мишах і яванських макаках (супотолгус), включаючи визначення діапазону доз, 28-денне дослідження токсичності багаторазового застосування препарату на макаках і 3-місячне дослідження токсичності багаторазового застосування препарату на мишах. Було показано, що при внутрішньовенному введенні (*i.v.*) багаторазові дози IMAB362 добре переносяться й мишами (сама більша тривалість щотижневого введення 3 місяці, найвищий рівень доз 400 мг/кг) і яванськими макаками (до 5 щотижневих застосувань аж до 100 мг/кг). Не виявлено ознак системної або місцевої токсичності. Зокрема, у жодному дослідженні токсичності не спостерігалось токсичної дії на шлунок. IMAB362 не викликає активації імунітету й вивільнення цитокінів. Не було відзначено негативних ефектів на репродуктивні органи самців або самок. IMAB362 не зв'язується із тканинами, які не мають мішені. Дослідження біорозподілення на мишах показало, що причиною відсутності гастральної токсичності найімовірніше є компартменталізація щільних контактів у місці просвіту в здоровому епітелії шлунка, яка, очевидно, значно зменшує

доступність IMAB362 епітопа. Ця компартименталізація пропадає після злоякісної трансформації, що приводить епітоп у стан, який піддається впливу IMAB362.

IMAB362 перебуває на ранній стадії клінічних випробувань. Фаза I клінічних випробувань проводиться на людях. 5 дозових груп (33 мг/м², 100 мг/м², 300 мг/м², 600 мг/м², 1000 мг/м²) по 3 пацієнти в кожній одержували одне внутрішньовенне введення IMAB362, спостереження проводили протягом 28 днів. IMAB362 добре переносився, при цьому не проводилося відповідного дослідження безпеки для пацієнтів. В одного пацієнта всі вимірювані пухлинні маркери були значно знижені в межах 4 тижнів після лікування. Протягом ІІа фази клінічних досліджень IMAB362 призначається повторно.

Представлені в цьому документі дані показують, що бісфосфонати, такі як золедронові кислота (ZA), зокрема, при введенні в комбінації з рекомбінантним інтерлейкіном-2 (IL-2), збільшують активність анти-CLDN18.2 антитіла, такого як IMAB362. Основним механізмом є активація й розмноження високоцитотоксичної популяції імунних клітин (γδ2 Т-клітини).

Крім того, ми представляємо результати, які демонструють, що хіміотерапевтичні засоби можуть стабілізувати або збільшувати експресію CLDN18.2 на поверхні ракових клітин, що приводить до підвищення доступності CLDN18.2 для анти-CLDN18.2 антитіла, такого як IMAB362. Спостерігалася синергійна дія анти-CLDN18.2 антитіла, такого як IMAB362, з певними хіміотерапевтичними режимами, зокрема, хіміотерапевтичними режимами, які використовуються при лікуванні раку шлунка або лікуванні солідних пухлин людини. Клітини раку людини, попередньо оброблені хіміотерапевтичними засобами, краще піддаються лізису, індукованому мішень-специфічним антитілом. На мишачих пухлинних моделях пригнічення пухлини з використанням анти-CLDN18.2 антитіла в комбінації з хіміотерапією перевершує застосування анти-CLDN18.2 антитіла у вигляді монотерапії.

Розкриття винаходу

Загалом, даний винахід надає комбіновану терапію для ефективного лікування й/або запобігання захворюванням, пов'язаним із клітинами, які експресують CLDN18.2, включаючи ракові захворювання, такі як рак шлунка, рак стравоходу, рак підшлункової залози, рак легенів, такий як недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), рак яєчників, рак товстої кишки, рак печінки, рак голови й шиї, рак жовчного міхура та їх метастази, зокрема, метастази раку шлунка, такі як пухлина Крукенберга, метастази в очеревину й/або лімфатичні вузли. Зокрема, переважно раковими захворюваннями є аденокарциноми шлунка, стравоходу, протоки підшлункової залози, жовчовивідних шляхів, легенів і яєчників.

В одному аспекті даний винахід пропонує спосіб лікування або запобігання ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, у комбінації із засобом, який стимулює γδ Т-клітини. Засіб, який стимулює γδ Т-клітини, може бути введено до, одночасно з або після введення антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, або його комбінації.

В одному варіанті здійснення γδ Т-клітини є Vγ9Vδ2 Т клітинами. В одному варіанті здійснення засіб, який стимулює γδ Т-клітини, є бісфосфонатом, таким як азотовмісний бісфосфонат (амінобісфосфонат). В одному варіанті здійснення засіб, який стимулює γδ Т-клітини, вибирають із групи, яка складається із золедронові кислоти, клодронові кислоти, ібандронові кислоти, памідророві кислоти, ризедророві кислоти, минодронові кислоти, олпадронові кислоти, алендронові кислоти, інкадронові кислоти та їх солей. В одному варіанті здійснення засіб, який стимулює γδ Т-клітини, уводять у комбінації з інтерлейкіном-2.

В одному варіанті здійснення спосіб винаходу додатково включає введення засобу, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2. Експресія CLDN18.2 бажано відбувається на поверхні ракової клітини.

Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може бути цитотоксичним і/або цитостатичним засобом. В одному варіанті здійснення засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, включає засіб, який викликає зупинку клітинного циклу або накопичення клітин в одній або більше фазах клітинного циклу, бажано в одній або більше фазах клітинного циклу, відмінних від G1-фази. Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може включати препарат, обраний із групи, яка складається з антрациклінів, сполук платини, аналогів нуклеозидів, таксанів і аналогів камптотечину або його проліків, та їх комбінацій. Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може включати препарат, обраний із групи, яка складається з епірубіцину, оксаліплатину, цисплатину, 5-фторурацилу або його проліків, таких як капецитабін, доцетаксел, іринотекан, та їх комбінацій. Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може включати комбінацію оксаліплатину й 5-фторурацилу або його проліків, комбінацію цисплатину й 5-фторурацилу або його проліків, комбінацію, щонайменше, одного антрацикліну й оксаліплатину, комбінацію, щонайменше, одного антрацикліну й

цисплатину, комбінацію, щонайменше, одного антрацикліну й 5-фторурацилу або його проліків, комбінацію, щонайменше, одного таксану й оксаліплатину, комбінацію, щонайменше, одного таксану й цисплатину, комбінацію, щонайменше, одного таксану й 5-фторурацилу або його проліків, або комбінацію, щонайменше, одного аналога камптотецину й 5-фторурацилу або його проліків. Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може бути засобом, який викликає імунотоксичну загибель клітин. Засіб, який викликає імунотоксичну загибель клітин, може включати засіб, обраний із групи, яка складається з антрациклінів, оксаліплатину та їх комбінацій. Засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може включати комбінацію епірубіцину й оксаліплатину. В одному варіанті здійснення способу запропонований винаходом передбачає введення, щонайменше, одного антрацикліну, щонайменше, однієї сполуки платини й, щонайменше, одного 5-фторурацилу і його проліків. Антрациклін можна вибрати із групи, яка складається з епірубіцину, доксорубіцину, даунорубіцину, ідарубіцину й валрубіцину. Бажано, антрациклін є епірубіцином. Сполуку платини можна вибрати із групи, яка складається з оксаліплатину й цисплатину. Нуклеозидний аналог може бути обраний із групи, яка складається з 5-фторурацилу і його проліків. Таксан можна вибрати із групи, яка складається з доцетакселу й паклітакселу. Аналог камптотецину може бути обраний із групи, яка складається з іринотекану й топотекану. В одному варіанті здійснення способу запропонований винаходом передбачає введення (i) епірубіцину, оксаліплатину й 5-фторурацилу, (ii) епірубіцину, оксаліплатину й капецитабіну, (iii) епірубіцину, цисплатину й 5-фторурацилу, (iv) епірубіцину, цисплатину й капецитабіну, або (v) фолінієвої кислоти, оксаліплатину й 5-фторурацилу.

Спосіб винаходу може додатково включати введення, щонайменше, одного додаткового хіміотерапевтичного засобу, який може бути цитотоксичним засобом.

Антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, може зв'язуватися з нативними епітопами CLDN18.2, присутніми на поверхні живих клітин. В одному варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN18.2. В одному варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, опосередковує знищення клітини за допомогою одного або більше з між опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC) лізису, індукції апоптозу й інгібування проліферації. В одному варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є моноклональним, химерним або гуманізованим антитілом або фрагментом антитіла. В одному варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, обраним із групи, яка складається з (i) антитіла, продукованого й/або отриманого від клону, депонованого під обліковим номером DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 або DSM ACC2810, (ii) антитіла, яке є химерною або гуманізованою формою антитіла згідно (i), (iii) антитіла, яке проявляє специфічність антитіла згідно (i) і (iv) антитіла, яке містить антигензв'язуючу ділянку або антигензв'язуючий сайт, зокрема, варіабельну область, антитіла згідно (i) антитіла, яке бажано проявляє специфічність, згідно (i). В одному варіанті здійснення антитіло з'єднане з терапевтичним засобом, таким як токсин, радіоізотоп, лікарський засіб або цитотоксичний засіб.

В одному варіанті здійснення способу запропонований винаходом передбачає введення антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватись з CLDN18.2, у дозі аж до 1000 мг/м². В одному варіанті здійснення способу запропонований винаходом передбачає введення антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватись з CLDN18.2, повторно в дозі від 300 до 600 мг/м².

В одному варіанті здійснення рак є CLDN18.2-позитивним. В одному варіанті здійснення ракове захворювання вибирають із групи, яка складається з раку шлунка, раку стравоходу, раку підшлункової залози, раку легенів, раку яєчників, раку товстої кишки, раку печінки, раку голови й шиї, раку жовчного міхура та їх метастазів. Ракове захворювання може бути пухлиною Крукенберга, метастазами в очеревину й/або лімфатичні вузли. В одному варіанті здійснення рак є аденокарциномою, зокрема аденокарциномою, що прогресує. В одному варіанті здійснення рак вибирають із групи, яка складається з раку шлунка, раку стравоходу, зокрема, нижнього відділу стравоходу, раку гастроєзофагіального з'єднання й гастроєзофагіального раку. Пацієнт може бути пацієнтом з негативним статусом за HER2/neu або пацієнтом з позитивним статусом за HER2/neu, але таким, для якого лікування трастузумабом не придатне.

Згідно з винаходом, CLDN18.2 бажано має амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 1.

У додатковому аспекті даний винахід пропонує медичний препарат, який містить антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і засіб, який стимулює убі Т-клітини. Медичний

препарат даного винаходу може додатково включати засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2. Антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, і необов'язковий засіб, який стабілізує і який збільшує експресію CLDN18.2, можуть бути присутніми у медичному препараті у вигляді суміші або окремо один від
 5 одного. Медичний препарат може бути набором, який включає перший контейнер, який містить антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2 і контейнер, який містить засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, і необов'язково контейнер, який містить засіб, який стабілізує і збільшує експресію CLDN18.2. Медичний препарат може додатково включати друковані інструкції із застосування препарату для лікування раку, зокрема, для застосування препарату згідно
 10 способу запропонованого винаходом. Різними варіантами втілення медичного препарату й, зокрема, засобу, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, і засобу, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, є описані вище відносно способу винаходу.

Даний винахід також пропонує описані тут засоби, такі як антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, для застосування в описаних тут способах, наприклад, для введення в
 15 комбінації із засобом, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, і необов'язково засобом, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2.

Інші ознаки й переваги даного винаходу стануть зрозумілими з наступного докладного опису й пунктів формули винаходу.

Короткий опис креслень

20 Фігура 1. Дія хіміотерапії на клітини раку шлунка. Культивування клітин KatolIII протягом 96 годин приводить до зупинки клітинного циклу в G0/G1-фазі й негативної регуляції CLDN18.2. Цитостатичні сполуки, які викликають зупинку клітинного циклу в різних фазах клітинного циклу (S-фаза(5-FU) або G2-фаза (епірубіцин)), стабілізують CLDN18.2-експресію.

25 Фігура 2. Дія хіміотерапії на клітини раку шлунка. a/b: Дія хіміотерапії на рівні транскрипта й білка CLDN18.2 у клітинах раку шлунка. c: Результати дослідження за допомогою проточної цитометрії позаклітинного зв'язування IMAB362 на клітинах раку шлунка, оброблених хіміотерапевтичними засобами.

30 Фігура 3. Дія хіміотерапії на клітини раку шлунка. Цитостатична сполука, яка викликає зупинку клітинного циклу в різних фазах клітинного циклу (S/G 2-фаза (іринотекан) або G2-фаза (доцетаксел)).

Фігура 4. IMAB 362-індукований ADCC опосередковує знищення клітин раку шлунка після попередньої обробки хіміотерапевтичними засобами.

35 Фігура 5. Дія хіміотерапії на клітини раку шлунка. a: Клітини, оброблені іринотеканом, доцетакселем або цисплатином демонструють більш низький рівень життєздатних клітин у порівнянні із клітинами, культивованими в середовищі. b: CLDN18.2 експресія в клітинах, оброблених іринотеканом, доцетакселем або цисплатином, є підвищеною в порівнянні із клітинами, культивованими в середовищі. c/d: Обробка клітин іринотеканом, доцетакселем або цисплатином збільшує потенційну можливість IMAB362 викликати ADCC.

Фігура 6. Ефекти хіміотерапії на CDC, індукований IMAB362.

40 Фігура 7. Ефекти хіміотерапії на ефекторні клітини.

Фігура 8. Розмноження PBMC у культурах з додаванням ZA/IL-2.

Фігура 9. Збагачення $\gamma\delta$ Т-клітин в PBMC культурах з додаванням ZA/IL-2.

Фігура 10. Збагачення $\gamma\delta$ Т-клітин у середовищі з додаванням ZA і зростаючої дози IL-
 2.

45 Фігура 11. Розмноження й цитотоксична активність $\gamma\delta$ Т-клітин після спільної інкубації з ZA-активованими моноцитами й клітинами раку людини.

Фігура 12. ZA-залежний розвиток різних типів клітин в PBMC-культурах.

Фігура 13. Поверхневі маркери на $\gamma\delta$ Т-клітинах після ZA/IL-2 обробки.

50 Фігура 14. ADCC активність $\gamma\delta$ Т-клітин у комбінації з IMAB362 на CLDN18.2-позитивних NUGC-4 клітинах раку шлунка.

Фігура 15. ADCC активність IMAB362 з використанням $\gamma\delta$ Т-клітин як ефекторних клітин.

Фігура 16. Дія ZA на поверхневе розташування CLDN18.2 на клітинах-мішенях.

Фігура 17. Ефекти хіміотерапії й ZA/IL-2- обробки на ефекторні клітини.

55 Фігура 18. Дослідження біорозподілення кон'югованих антитіл у мишей.

Фігура 19. Раннє лікування HEK293~CLDN18.2 ксенотрансплантатів пухлини.

Фігура 20. Лікування розвинених HEK293~CLDN18.2 ксенотрансплантатів пухлини.

Фігура 21. Дія IMAB362 на ріст підшкірних ксенотрансплантатів раку шлунка.

60 Фігура 22. Ефекти імунотерапії IMAB362 на NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантати карциноми шлунка.

Фігура 23. Ефекти комбінованої терапії IMAB362 і режиму EOF на NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантати.

Фігура 24. Ефекти комбінованої терапії IMAB362 і EOF режиму на NUGC-4~CLDN18.2 ксенотрансплантати.

5 Фігура 25. Дія ZA/IL-2-індукованих V γ 9V δ 2 T-клітин на контроль макроскопічних пухлин з використанням IMAB362 у мишей NSG.

Фігура 26. Ефекти комбінованої терапії IMAB362 і EOF режиму на CLS-103~cldn18.2 алотрансплантати пухлин.

Докладний опис винаходу

10 Незважаючи на те, що даний винахід докладно описаний далі, зрозуміло, що цей винахід не обмежується конкретними методиками, протоколами й реагентами, описаними тут, оскільки вони можуть відрізнятися. Також слід розуміти, що використана в описі термінологія призначена тільки для опису окремих варіантів здійснення й не покликана обмежувати обсяг даного винаходу, який буде обмежуватися тільки прикладеними пунктами формули винаходу. Якщо не
15 зазначено інакшого, усі технічні й наукові терміни, використані в описі, мають ті ж самі значення, які звичайно зрозумілі пересічному фахівцеві у даній галузі техніки.

Надалі будуть описані елементи даного винаходу. Ці елементи перелічуються в конкретних варіантах здійснення, однак, повинно бути зрозумілим, що вони можуть поєднуватися будь-яким
20 чином і в будь-якій кількості для створення додаткових варіантів здійснення. Описані різним чином приклади й кращі варіанти здійснення не повинні тлумачитися як такі, що обмежують даний винахід тільки точно описаними варіантами здійснення. Слід розуміти, що цей опис підтримує й розглядає варіанти здійснення, які поєднують точно описані варіанти здійснення з будь-яким числом розкритих і/або кращих елементів. Більше того, будь-які перестановки й комбінації всіх описаних елементів у цій заявці слід розглядати як розкриті описом даної заявки, якщо контекст не диктує іншого.
25

Бажано, використані в описі терміни визначаються так, як описано в "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, i H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

30 При здійсненні даного винаходу використовуються, якщо не зазначене інакше, звичайні методи хімії, біохімії, клітинній біології, імунології й методи рекомбінантних ДНК, які пояснюються в літературі, присвяченій даної галузі техніки (дивися, наприклад, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Протягом цього докладного опису й наступних пунктів формули винаходу, якщо контекст не
35 вимагає іншого, слід розуміти, що слово "містити" і його варіанти, такі як "містить" і "який утримує", припускає включення певного члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій, а не виключення будь-якого іншого члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій, хоча в деяких варіантах здійснення такий інший член, ціле число або стадія або група членів, цілих чисел або стадій може виключатися, тобто об'єкт винаходу
40 полягає у включенні встановленого члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій. Терміни "a" і "an" і "the" і подібні посилання, використані в контексті опису винаходи (особливо в контексті формули винаходу) слід тлумачити, як такі, що включають і однину й множину, якщо в описі не зазначено іншого або інше явно не продиктоване контекстом. Перерахування меж значень в описі служить тільки як спосіб скорочення згадування окремо
45 кожного окремого значення, що попадає в межі. Якщо не зазначене інше, кожне конкретне значення включається до докладного опису, як ніби воно було окремо перераховане в описі. Усі описані тут методи можуть здійснюватися в будь-якому придатному порядку, якщо в описі не зазначене інше або іншим способом явно не суперечить контексту. Використання всіх без винятку прикладів або характерних виразів (наприклад, "такий як"), наданих в описі, вживається
50 тільки з метою кращої ілюстрації винаходу й не обмежує рамки винаходу, заявлені в іншій формі. Формулювання докладного опису не повинні бути витлумачені, як такі, що означають який-небудь незаявлений елемент, істотний для здійснення винаходу на практиці.

Протягом тексту даної заявки процитовано кілька документів. Кожний з наведених в описі документів (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, специфікації виробника,
55 інструкції тощо), чи то вище або нижче за текстом, повністю включаються до опису як посилання. Ніщо в описі не слід розглядати як допущення, що винахід не має права датувати таке розкриття відповідно до попереднього винаходу.

Термін "CLDN18" відноситься до клаудину 18 і включає будь-які варіанти, включаючи
60 клаудин 18 сплайс-варіант 1 (клаудин 18.1 (CLDN18.1)) і клаудин 18 сплайс-варіант 2 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)).

Термін "CLDN18.2" переважно має відношення до людського CLDN18.2 і, зокрема, до білка, який містить, бажано складається з амінокислотної послідовності відповідно до SEQ ID NO: 1 зі списку послідовностей або варіанта зазначеної амінокислотної послідовності.

5 Термін "CLDN18.1" переважно має відношення до людського CLDN18.1 і, зокрема, до білка, що містить, бажано складається з амінокислотної послідовності відповідно до SEQ ID NO: 2 зі списку послідовностей або варіанта зазначеної амінокислотної послідовності.

Термін "варіант" згідно з винаходом має відношення, зокрема, до мутантів, сплайс-варіантів, ізоформ, алельних варіантів, видових варіантів і видових гомологів, зокрема, наявних у природі. Алельний варіант має відношення до зміни в нормальній послідовності гена, значення якого часто є незрозумілим. Повне генетичне секвенування часто встановлює численні алельні варіанти для даного гена. Видовим гомологом є послідовність нуклеїнових кислот або амінокислот, джерелом походження яких є інший вид, що відрізняється від виду походження даної послідовності нуклеїнових кислот або амінокислот. Термін "варіант" буде включати будь-які посттрансляційно модифіковані варіанти й конформаційні варіанти.

15 Згідно з винаходом термін "CLDN18.2-позитивний рак" означає рак за участю ракових клітин, які експресують CLDN18.2, бажано на поверхні зазначених ракових клітин.

Термін "поверхня клітини" використовується відповідно до його звичайного значення в даній галузі, і в такий спосіб передбачає зовнішню поверхню клітини, доступну для зв'язування з білками й іншими молекулами.

20 CLDN18.2 експресується на поверхні клітин у тому випадку, якщо він розташовується на поверхні зазначених клітин, і є доступним для зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами при додаванні їх до клітин.

Згідно з винаходом, вважають, що CLDN18.2 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії є більш низьким у порівнянні з експресією в клітинах шлунка або тканині шлунка. Бажано, рівень експресії становить менше, ніж 10 %, бажано менше ніж 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05 % експресії в клітинах шлунка або тканині шлунка або навіть нижче. Переважно, вважають, що CLDN18.2 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від тканини шлунка, не більше, ніж в 2 рази, бажано в 1, 5 рази, і бажано не перевищує рівень експресії в зазначеній нераковій тканині. Переважно, вважають, що CLDN18.2 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії нижче межі виявлення, і/або якщо рівень експресії є занадто низьким, щоб забезпечити можливість зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами при додаванні їх до клітин.

Згідно з винаходом CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від тканини шлунка, бажано більше, ніж в 2 рази, краще в 10 разів, в 100 разів, в 1000 разів або в 10000 разів. Переважно, CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії вище межі виявлення, і/або якщо рівень експресії є досить високим, щоб забезпечити можливість зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами при додаванні їх до клітин. Бажано, експресований у клітині CLDN18.2 експресується або експонується на поверхні зазначеної клітини.

40 Згідно з винаходом термін "хвороба" відноситься до будь-якого патологічного стану, включаючи рак, зокрема, до описаних у даному документі форм раку. Будь-які згадування раку або конкретних форм раку в даному документі також включають його метастази. У кращому варіанті здійснення хвороба, яку необхідно лікувати відповідно до даної заявки, стосується клітин, які експресують CLDN18.2.

45 "Хвороби, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2," або подібні вирази означають згідно з винаходом, що CLDN18.2 експресується в клітинах хворої тканини або органа. В одному варіанті здійснення експресія CLDN18.2 у клітинах хворої тканини або органа є підвищеною в порівнянні зі станом у здоровій тканині або органі. Під підвищенням слід розуміти підвищення, щонайменше, на 10 %, зокрема, щонайменше, на 20 %, щонайменше, на 50 %, щонайменше, на 100 %, щонайменше, на 200 %, щонайменше, на 500 %, щонайменше, на 1000 %, щонайменше, на 10 000 % або навіть більше. В одному варіанті здійснення експресія виявлена тільки у хворій тканині, тоді як експресія в здоровій тканині пригнічена. Згідно з винаходом, хвороби, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2, включають ракові захворювання. Крім того, згідно з винаходом раковими захворюваннями переважно є ті, у яких ракові клітини експресують CLDN18.2.

55 При використанні в описі термін "ракова хвороба" або "рак" включає хворобу, яка характеризується неправильно регульованим клітинним ростом, проліферацією, диференціюванням, адгезією й/або міграцією. Під "раковою клітиною" слід розуміти аномальну клітину, яка росте за допомогою швидкої, неконтрольованої клітинної проліферації й продовжує рости після стимулу (впливу), що ініціює припинення нового росту. Бажано "ракова хвороба"

характеризується клітинами, які експресують CLDN18.2, а ракова клітина експресує CLDN18.2. Клітина, яка експресує CLDN18.2, переважно є раковою клітиною, переважно описаних тут видів раку.

"Аденокарцинома" є раком, що виникає в залозистій тканині. Ця тканина до того ж є частиною великої групи тканин, відомих як епітеліальна тканина. Епітеліальна тканина включає шкіру, залози й цілий ряд інших тканин, що вистилають порожнини й органи тіла. З погляду ембріології епітелій походить із ектодерми, ендодерми й мезодерми. Щоб відноситися до аденокарциноми, клітини необов'язково повинні бути частиною залози, за умови, що вони мають секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати в деяких вищих тварин, включаючи людей. Добре диференційовані аденокарциноми мають тенденцію бути подібними до залозистої тканини, з якої вони походять, у той час як погано диференційовані можуть не бути подібними до залозистої тканини. За допомогою фарбування клітин, отриманих з біопсійного матеріалу, патолог визначає, чи є пухлина аденокарциномою або іншим типом раку. Аденокарциноми можуть виникати в багатьох тканинах організму внаслідок широкого поширення залоз в організмі. Поряд з тим, що кожна залоза не може секретувати ту саму речовину, коли в клітині існує зовнішньосекреторна функція, вона вважається залозистою, і тому її злоякісна форма називається аденокарциномою. Злоякісні аденокарциноми вторгаються в інші тканини й дають метастази, які також проникають в інші тканини. Аденокарцинома яєчника є найпоширенішим типом карциноми яєчника. Сюди включаються серозні й слизові аденокарциноми, світлоклітинна аденокарцинома й ендометриоїдна аденокарцинома.

Під "метастазуванням" розуміють поширення ракових клітин з первинного місця розташування в іншу частину організму. Утворення метастаз є дуже складним процесом і залежить від відділення злоякісних клітин від первинної пухлини, вторгнення (інвазії) у позаклітинний матрикс, проникання в ендотеліальні базальні мембрани для проникнення в порожнину тіла й судин, а потім, після транспортування кровотоком, інфільтрації в органі-мішені. Нарешті, ріст нової пухлини в місці-мішені залежить від ангиогенезу. Метастази пухлини можуть виникати навіть після видалення первинної пухлини, тому що пухлинні клітини або компоненти можуть залишитися й розвинути метастатичний потенціал. В одному варіанті здійснення термін "метастаза" згідно з винаходом має відношення до "віддаленої метастази", тобто метастази, видаленої від первинної пухлини й системи регіональних лімфатичних вузлів. В одному варіанті здійснення термін "метастаза" згідно з винаходом відноситься до метастаз в лімфатичному вузлі. Однієї конкретною формою метастаз, яка піддається лікуванню за допомогою терапії запропонованої винаходом, є метастаза, яка бере початок від раку шлунка як первинного вогнища. У кращих варіантах здійснення така метастаза раку шлунка є пухлиною Крукенберга, метастазами в очеревину й/або метастазами в лімфатичні вузли.

Пухлина Крукенберга є рідкісною метастатичною пухлиною яєчника, яка охоплює від 1 % до 2 % від усіх пухлин яєчника. Прогноз пухлини Крукенберга залишається поганим, при цьому не існує загальноприйнятого лікування для пухлини Крукенберга. Пухлина Крукенберга є метастатичною перстневидноклітинною аденокарциномою яєчника. Шлунок є первинним вогнищем для більшості випадків пухлини Крукенберга (70 %). Наступними за поширеністю первинними локалізаціями є карциноми товстої кишки, апендикса й молочної залози (в основному інвазивна долькова карцинома). Повідомлялося про одиничні випадки пухлини Крукенберга, які походять з карциноми жовчного міхура, жовчних проток, підшлункової залози, тонкого кишечника, Фатерова сосочка, шийки матки й сечового міхура/сечової протоки. Інтервал між постановкою діагнозу первинної карциноми й наступним виявленням ураження яєчника становить звичайно 6 місяців або менше, однак повідомлялося й про більш тривалі строки. У багатьох випадках, первинна пухлина є дуже маленькою й може залишитися непоміченою. Попередня карцинома шлунка або іншого органа в анамнезі спостерігається тільки в 20-30 % випадків.

Пухлина Крукенберга являє приклад селективного поширення раку, найчастіше в напрямку шлунок – яєчник. Ця "вісь" поширення пухлини історично привертає увагу багатьох патоморфологів, зокрема, коли було виявлено, що новоутворення в шлунку селективно метастазують у яєчники, не уражаючи інших тканин. Шлях метастазів карциноми шлунка в яєчники був загадкою протягом тривалого часу, однак тепер очевидно, що ретроградне поширення лімфатичними судинами є найбільш імовірним шляхом метастазування.

Пухлини Крукенберга з'являються в молодих жінок, що є незвичайним для пацієнтів з метастатичною карциномою, яка спостерігається в більшості випадків на п'ятому десятку життя, із середнім віком 45 років. Цей ранній вік поширення може бути почасти пов'язаний з підвищеною частотою випадків перстневидноклітинної карциноми шлунка в молодих жінок. симптоми, які при цьому часто зустрічаються, як правило, пов'язані із залученням у процес

яєчників, найпоширенішими з яких є біль у животі й здуття живота (в основному внаслідок двосторонньої великої маси яєчників). В іншій частині пацієнтів спостерігаються неспецифічні шлунково-кишкові симптоми або симптоми відсутні. На додачу до цього, пухлина Крукенберга за наявним даними пов'язана з маскулінізацією, що є результатом виділення гормонів строною яєчників. В 50 % випадків у пацієнтів є асцит, що звичайно містить злоякісні клітини.

Пухлина Крукенберга є двосторонньою більше ніж в 80 % відомих випадків. Як правило, яєчники збільшені асиметрично й мають горбистий контур. Поверхні зрізів жовтого або білого кольору; звичайно це солідні пухлини, хоча іноді бувають кистовидними. Важливо, щ поверхня капсули яєчників з пухлиною Крукенберга в більшості випадків є гладкою й не має спайок або очеревинних відкладань. Слід зазначити, що інші метастатичні пухлини в яєчнику, як правило, пов'язані з поверхневими імплантатами. Це може пояснювати, чому макроскопічне патоморфологічне дослідження пухлини Крукенберга може давати хибне враження первинної пухлини яєчника. Однак, двостороння симетрія пухлини Крукенберга відповідає його метастатичній природі.

Слід зазначити високий відсоток загальної летальності серед пацієнтів з пухлиною Крукенберга. Більшість пацієнтів умирає протягом 2 років (медіана виживання 14 місяців). Деяка кількість досліджень показує, що прогноз є поганим, у тому випадку, коли первинна пухлина встановлена після виявлення метастазів у яєчниках, при цьому прогноз стає ще гіршим, якщо первинна пухлина залишається невиявленою.

У літературі оптимальна стратегія лікування пухлини Крукенберга чітко не встановлена. Питання здійснення хірургічного видалення недостатньо врегульоване. Хіміотерапія або радіотерапія не має значної дії на прогноз пацієнтів з пухлиною Крукенберга.

Під терміном "лікувати" слід розуміти введення суб'єктові сполуки або композиції або комбінації сполук або композицій з метою запобігання або усунення хвороби, включаючи зменшення розмірів пухлини або кількості пухлин у суб'єкта; затримку або уповільнення хвороби в суб'єкта; інгібування або уповільнення розвитку нової хвороби в суб'єкта; зменшення частоти й тяжкості симптомів і/або рецидивів у суб'єкта, що має в цей час або, який раніше мав захворювання; і/або подовження, тобто збільшення тривалості життя суб'єкта.

Зокрема, термін "лікування хвороби" включає лікування, зменшення тривалості, полегшення, запобігання, уповільнення або інгібування прогресу або погіршення, або запобігання або затримку початку хвороби або її симптомів.

Згідно з винаходом термін "пацієнт" позначає суб'єкта, який потребує лікування, зокрема, хворого суб'єкта, включаючи людей, нелюдиноподібних приматів або інших тварин, зокрема, ссавців, таких як корови, коні, свині, вівці, кози, собаки, кішки, або гризунів, таких як миші й пацюки. В найкращому варіанті здійснення пацієнт є людиною.

γδ Т-клітини (гама дельта Т-клітини) представляють невелику підгрупу Т-клітин, які мають різні Т-клітинні рецептори (TCR) на поверхні. Більшість Т-клітин мають TCR, які складаються із двох ланцюгів глікопротеїнів, які називаються α- і β-TCR ланцюги. На противагу до цього, в γδ Т-клітин TCR складається з одного γ-ланцюга й одного δ-ланцюга. Ця група Т-клітин ще менше поширена, ніж αβ Т-клітини. У людини γδ Т клітини відіграють важливу роль у відповідях, пов'язаних з наглядом за стресами, подібними до інфекційних хвороб і аутоімунних реакцій. Крім того, вважається, що індуковані трансформацією зміни в пухлинах викликають відповіді, пов'язані з наглядом за стресом, які опосередковані γδ Т-клітинами, і збільшують протипухлинний імунітет. Важливо відзначити, що після захоплення антигену активовані γδ Т-клітини в місцях ушкоджень забезпечують цитокіни (наприклад, INFγ, TNFα) і/або хемокіни, які опосередковують залучення інших ефektorних клітин, і демонструють безпосередні ефektorні функції, такі як цитотоксичність (за допомогою рецепторів клітинної смерті й цитолітичних гранул) і ADCC.

Більша частина γδ Т-клітин у периферійній крові експресує Vγ9Vδ2 Т-клітинний рецептор (TCRγδ). Vγ9Vδ2 Т-клітини характерні тільки для людей і приматів і, як вважається, відіграють попереджувальну й істотну роль у відчутті "небезпеки" у відношенні інвазивних патогенів, оскільки їх кількість різко збільшується при багатьох гострих інфекціях і може перевищувати кількість усіх інших лімфоцитів у межах декількох днів, наприклад, при туберкульозі, сальмонельозі, ерліхіозі, бруцельозі, туляремії, лістеріозі, токсоплазмозі й малярії.

γδ Т-клітини реагують на невеликі непептидні фосфорильовані антигени (фосфоантигени), такі як пірофосфати, синтезовані бактеріями, і ізопентеніл пірофосфат (IPP), продукований клітинами ссавців за допомогою мевалонатного шляху. Тоді як вироблення IPP у нормальних клітинах є недостатнім для активації γδ Т-клітин, дисрегуляція мевалонатного шляху в пухлинних клітинах призводить до накопичення IPP і активації γδ Т-клітин. IPP також може бути терапевтично підвищеним за допомогою амінобісфосфонатів, які інгібують фермент

мевалонатного шляху фарнезил пірофосфат синтази (FPPS). Серед інших, такого роду амінобісфосфонатом є золедренова кислота (ZA, золедронат, Zometatm, Novartis), яка уже вводиться пацієнтам у клініці для лікування остеопорозу й метастатичного захворювання кісток. Після обробки PBMCs *in vitro*, ZA поглинається винятково моноцитами. IPP накопичується в моноцитах, і вони видозмінюються в антиген-презентуючі клітини, які стимулюють розвиток $\gamma\delta$ Т-клітин. У даному контексті кращим є додавання інтерлейкіну-2 (IL-2) як фактора росту й виживання для активованих $\gamma\delta$ Т-клітин. І нарешті, повідомлялося, що деякі алкільовані аміни активують $\gamma\delta$ Т-клітини *in vitro*, однак, тільки в мілімолярних концентраціях.

Згідно з винаходом термін "засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини," має відношення до сполук, які стимулюють розвиток $\gamma\delta$ Т-клітин, зокрема, $\gamma\delta$ Т-клітин, *in vitro* і/або *in vivo*, зокрема шляхом індукції активації й розмноження $\gamma\delta$ Т-клітин. Бажано, термін має відношення до сполук, які збільшують, *in vitro* і/або *in vivo*, вироблення ізопентеніл пірофосфату (IPP) у клітинах ссавців, переважно шляхом інгібування ферменту мевалонатного шляху фарнезил пірофосфат синтази (FPPS).

Однієї окремою групою сполук, які стимулюють $\gamma\delta$ Т-клітини, є бісфосфонати, зокрема азотовмісні бісфосфонати (N-бісфосфонати; амінобісфосфонати).

Наприклад, придатні для використання у винаході бісфосфонати можуть включати одну або більше з поміж наступних сполук, включаючи їх аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, складні ефіри, кон'югати й проліки:

[1-гідрокси-2-(1H-імідазол-1-іл)етан-1,1-диіл]біс (фосфонова кислота), золедренова кислота, наприклад, золедронат;

(дихлор-фосфоно-метил) фосфонова кислота, наприклад, клодронат

{1-гідрокси-3-[метил(пентил)аміно]пропан-1,1-диіл}біс (фосфонова кислота), ібандренова кислота, наприклад, ібандронат

(3-аміно-1-гідроксипропан-1,1-диіл)біс(фосфонова кислота), памідренова кислота, наприклад, памідронат;

(1-гідрокси-1-фосфоно-2-піридин-3-іл-етил) фосфонова кислота, ризедренова кислота, наприклад, ризедронат;

(1-гідрокси-2-імідазо[1,2-а]піридин-3-іл-1-фосфоноетил) фосфонова кислота, мінодренова кислота;

[3-(диметиламіно)-1-гідроксипропан-1,1-диіл]біс (фосфонова кислота), олпадренова кислота.

[4-аміно-1-гідрокси-1-(гідрокси-оксидо-фосфорил)-бутил] фосфонова кислота, алендренова кислота, наприклад, алендронат;

[(Циклогептиламіно)метилен]біс(фосфонова кислота), інкадренова кислота;

(1-гідроксиетан-1,1-диіл)біс(фосфонова кислота), етидренова кислота, наприклад, етидронат; і

{[4-хлорфеніл]тіо}метилен}біс(фосфонова кислота), тилудренова кислота.

Згідно з винаходом, золедренова кислота (INN) або золедронат (який продається компанією Novartis під торговими марками Zometa, Zomera, Aclasta і Reclast) є особливо бажаним бісфосфонатом. Zometa використовується для запобігання переломів кісток скелету в пацієнтів з такими видами раку, як множинна мієлома й рак передміхурової залози, а також для лікування остеопорозу. Препарат також використовується для лікування гіперкальціємії при злоякісних новоутвореннях і може бути корисним при лікуванні болі, яка є результатом кісткових метастазів.

В одному з кращих варіантів здійснення, засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, згідно з винаходом уводять у комбінації з IL-2. Показано, що така комбінація, зокрема, є ефективною при опосередкуванні розмноження й активації $\gamma\delta$ Т-клітин.

Інтерлейкін-2 (IL-2) - це інтерлейкін, тип цитокіна - сигнальної молекули в імунній системі. Це білок, який "притягає" лімфоцити і є частиною природної імунної відповіді на мікробну інфекцію, і відіграє роль при проведенні розрізнення між "чужим" ("не своїм") і "своїм". IL-2 опосередковує свої ефекти шляхом зв'язування з IL-2 рецепторами, які експресуються лімфоцитами.

IL-2, який використовується у винаході, може бути будь-яким IL-2, який сприяє або забезпечує можливість стимулювання $\gamma\delta$ Т-клітин, і може походити від будь-яких видів, бажано, від людини. IL-2 може бути ізольованим, отриманим рекомбінантним шляхом або синтетичним IL-2, може бути інтерлейкіном природного походження або модифікованим IL-2.

Термін "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," відноситься до засобу або комбінації засобів, забезпечення наявності яких у клітинах приводить до підвищення рівнів РНК і/або білка CLDN18.2, бажано підвищення рівнів білка CLDN18.2 на клітинній поверхні, у порівнянні з умовами, коли клітини не забезпечуються даним засобом або комбінацією засобів. Переважно, клітина є раковою клітиною, зокрема, раковою клітиною, яка експресує CLDN18.2,

такою як клітини описаних тут видів раку. Термін "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," відноситься, зокрема, до засобу або комбінації засобів, забезпечення наявності яких у клітинах приводить до більш високої щільності CLDN18.2 на поверхні зазначених клітин у порівнянні з умовами, коли клітини не забезпечуються даним засобом або комбінацією засобів.

"Стабілізація експресії CLDN18.2" включає, зокрема, ситуацію, коли даний засіб або комбінація засобів запобігає зниженню або зменшує зниження експресії CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 могла б знижуватися без забезпечення наявності засобу або комбінації засобів, а забезпечення наявності засобу або комбінації засобів запобігає зазначеному зниженню або зменшує зниження CLDN18.2 експресії. "Збільшення експресії CLDN18.2" включає, зокрема, ситуацію, коли даний засіб або комбінація засобів збільшує експресію CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 могла б знижуватися, залишатися в основному постійною або збільшуватися без забезпечення наявності засобу або комбінації засобів, а забезпечення наявності засобу або комбінації засобів збільшує CLDN18.2 експресію в порівнянні з умовами без забезпечення наявності засобу або комбінації засобів, так що одержана в результаті експресія є більш високою в порівнянні із ситуацією, за якої експресія CLDN18.2 могла знижуватися, залишатися в основному постійною або збільшуватися без забезпечення наявності засобу або комбінації засобів.

Згідно з винаходом термін "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," включає хіміотерапевтичні засоби або комбінації хіміотерапевтичних засобів, таких як цитостатичні засоби. Хіміотерапевтичні засоби можуть впливати на клітини одним з наступних способів: (1) можуть пошкоджувати ДНК клітин, так що вони не здатні більше відтворюватися, (2) інгібувати синтез нових ниток ДНК, так що стає неможливою клітинна реплікація, (3) зупиняти мітотичні процеси в клітинах, так що клітини не можуть ділитися на дві клітини.

Згідно з винаходом термін "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," переважно відноситься до засобу або комбінації засобів, таких як цитостатичні сполуки або комбінація цитостатичних сполук, забезпечення наявності яких у клітинах, зокрема, ракових клітинах, призводить до зупинки або накопичення клітин в одній або більше фазах клітинного циклу, бажано в одній або більше фазах клітинного циклу, відмінних від G1- і G0-фаз, бажано відмінних від G1-фази, бажано в одній або більше з поміж G2- або S-фази клітинного циклу, такої як G1/G2-, S/G2-, G2- або S-Фаза клітинного циклу. Термін "зупинка або накопичення клітин в одній або більше фазах клітинного циклу" означає, що відсоток клітин, які перебувають у зазначеній одній або більш фазах клітинного циклу, збільшується. Для самовідтворення кожна клітина проходить цикл, який включає чотири фази. Перша фаза називається G1-фаза, у цій фазі клітина готується до подвоєння своїх хромосом. Друга фаза називається S-фаза, у цій фазі відбувається синтез і подвоєння ДНК. Наступна фаза – це G2-фаза, у ній відбувається подвоєння РНК і білка. Заклучна фаза – це М-фаза, яка є фазою фактичного поділу клітини. У цій кінцевій стадії подвоєні ДНК і РНК розходяться й переміщуються до різних кінців клітини, і клітина дійсно ділиться на дві ідентичні, функціональні клітини. Хіміотерапевтичні засоби, які пошкоджують ДНК, як правило, призводять до накопичення клітин у фазі G1 і/або G2. Хіміотерапевтичні засоби, що перешкоджають клітинному росту, втручаючись у синтез ДНК, наприклад, антиметаболіти, як правило, призводять до накопичення клітин в S-Фазі. Прикладами цих лікарських засобів є 6-меркаптопурин і 5-фторурацил.

Згідно з винаходом термін "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," включає антрацикліни, такі як епірубіцин, сполуки платини, такі як оксаліплатин і цисплатин, аналоги нуклеозидів, такі як 5-фторурацил або його проліки, таксани, такі як доцетаксел, і аналоги камптотецину, такі як іринотекан і топотекан, і комбінації лікарських препаратів, такі як комбінації лікарських засобів, які містять один або більше антрациклінів, таких як епірубіцин, оксаліплатин і 5-фторурацил, такі як комбінація лікарських засобів, які містять оксаліплатин і 5-фторурацил, або інші описані тут лікарські комбінації.

В одному з кращих варіантів здійснення "засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2," є "засобом, який викликає імунну загибель клітин".

За певних обставин ракові клітини можуть вступати на шлях летального стресу, пов'язаного з виділенням визначеної із просторово-часової точки зору комбінації сигналів, яка перетворюється імунною системою на активацію пухлино-специфічних імунних відповідей (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798-804). За такого розвитку подій ракові клітини починають виділяти сигнали, які сприймаються вродженими імунними ефекторами, такими як дендритні клітини, щоб ініціювати когнатну (cognate) імунну відповідь, яка зачіпає CD8+ Т-клітини й IFN-γ сигнальний шлях, так що загибель пухлинної клітини може викликати ефективну протипухлинну імунну відповідь. Ці сигнали включають предапоптотичну експозицію білка-шаперона ендоплазматичного ретикулула (ER) калретикуліну (CRT) на клітинній поверхні,

преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1. У сукупності ці процеси становлять молекулярні детермінанти імуногенної загибелі клітин (ICD). Антрацикліни, оксалиплатин і γ-опромінення здатні індукувати усі сигнали, які визначають ICD, у той час як одного цисплатину, наприклад, недостатньо для індукції переміщення CRT від ER до

поверхні клітин, що гинуть – процесу, який передбачає стрес ER - і потрібне додавання тапсигаргину, індуктора ER-стресу.

Згідно з винаходом термін "засіб, який викликає імуногенну загибель клітин," відноситься до засобу або комбінації засобів, наявність яких у клітинах, зокрема ракових клітинах, дозволяє стимулювати вступ клітини на шлях летального стресу, який в остаточному підсумку спричиняє пухлино-специфічні імунні відповіді. Зокрема, "засіб, який викликає імуногенну загибель клітин," (при забезпеченні його наявності в клітинах) викликає виділення клітинами визначених із просторово-часової точки зору комбінації сигналів, включаючи, зокрема, преапоптотичну експозицію білка-шаперона ендоплазматичного ретикулула (ER) калретикуліну (CRT) на клітинній поверхні, преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1.

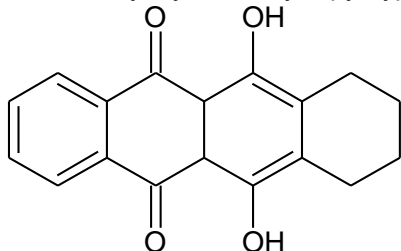
Згідно з винаходом термін "засіб, який викликає імуногенну загибель клітин", включає антрацикліни й оксалиплатин.

Антрацикліни – це клас лікарських засобів, які звичайно використовуються у хіміотерапії пухлин, також відомий за назвою антрациклінових антибіотиків. У структурному відношенні всі антрацикліни мають загальну структуру 7,8,9,10-тетрагідротетрацен-5,12-хінону, який має чотири кільця й звичайно потребують глікозилування в специфічних сайтах.

Антрацикліни переважно здійснюють один або більше із наступних механізмів дії: 1. Інгібування синтезу ДНК і РНК шляхом інтеркаляції між парами основ ДНК/РНК ланцюжка, що запобігає реплікації швидкозростаючих ракових клітин. 2. Інгібування ферменту топоізомерази II, що перешкоджає релаксації суперспіральної ДНК і в такий спосіб блокує транскрипцію й реплікацію ДНК. 3. Утворення залізо-опосередкованих вільних кисневих радикалів, що пошкоджують ДНК і мембрани клітин.

Згідно з винаходом термін "антрациклін" переважно має відношення до препарату, бажано протипухлинного препарату, призначеного для індукції апоптозу, бажано шляхом інгібування повторного зв'язування (rebinding) ДНК із топоізомеразою.

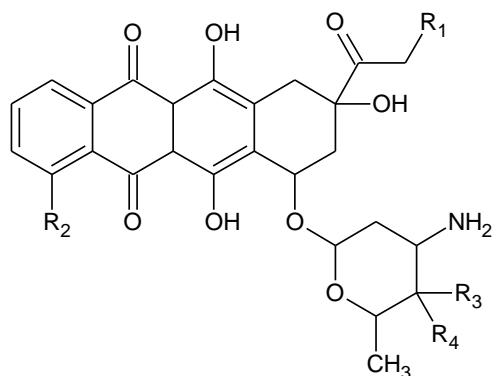
Бажано, згідно з винаходом термін "антрациклін" в основному відноситься до класу сполук, які мають наступну кільцеву структуру



включаючи аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, складні ефіри, кон'югати та їх проліки.

Приклади антрациклінів і аналогів антрациклінів включають, але не обмежуються цим, даунорубіцин (дауноміцин), доксорубіцин (адриаміцин), епірубіцин, ідарубіцин, родоміцин, пірарубіцин, валрубіцин, N-трифтор-ацетил доксорубіцин-14-валерат, аклациноміцин, морфолінодоксорубіцин (морфоліно-DOX), ціаноморфоліно-доксорубіцин (ціаноморфоліно-DOX), 2-піроліно-доксорубіцин (2-PDOX), 5-імінодауноміцин, мітоксантрон і аклациноміцин А (акларубіцин). Мітоксантрон є членом класу антрацендіонів, аналогів антрациклінів, які втратили цукровий компонент антрациклінів, але, які зберегли плоску поліциклічну структуру ароматичних кілець, яка забезпечує можливість інтеркаляції в ДНК.

Найкращим антрацикліном згідно з винаходом є сполуки наступної формули:

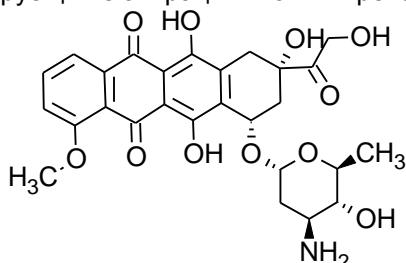


у якій

R_1 вибирають із групи, яка складається з H і OH, R_2 вибирають із групи, яка складається з H і OMe, R_3 вибирають із групи, яка складається з H і OH, і R_4 вибирають із групи, яка складається з H і OH.

В одному варіанті здійснення R_1 є H, R_2 є OMe, R_3 є H, і R_4 є OH. В іншому варіанті здійснення R_1 є OH, R_2 є OMe, R_3 є H, і R_4 є OH. В іншому варіанті здійснення R_1 є OH, R_2 є OMe, R_3 є OH, і R_4 є H. В іншому варіанті здійснення R_1 є H, R_2 є H, R_3 є H, і R_4 є OH.

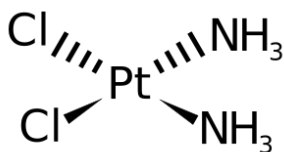
Зокрема, передбачено, що антрацикліном в контексті даного винаходу є епірубіцин. Епірубіцин є антрацикліновим препаратом, який мають наступну формулу:



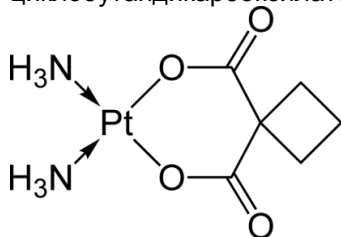
і продається під торговою маркою еленс у США й під торговою маркою фарморубіцин або епірубіцин (Ebewe) в інших країнах. Зокрема, термін "епірубіцин" відноситься до сполуки (8R, 10S)-10-[(2S, 4S, 5R, 6S)-4-аміно-5-гідрокси-6-метил-оксан-2-іл]окси-6,11-дигідрокси-8-(2-гідроксиацетил)-1-метокси-8-метил-9,10-дигідро-7H-тетрацен-5,12-діону. Епірубіцин є кращим у порівнянні з доксорубіцином, найбільш популярним антрацикліном, у деяких хіміотерапевтичних режимах, тому що, очевидно, він викликає менше побічних ефектів.

Згідно з винаходом термін "сполука платини" має відношення до сполук, які містять платину у своїх структурах, таких як платинові комплекси, і включає такі сполуки, як цисплатин, карбоплатин і оксаліплатин.

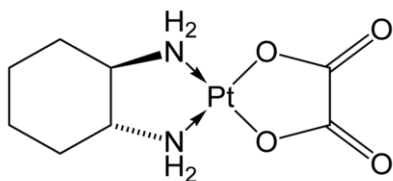
Термін "цисплатин" відноситься до сполуки цис-діамінодихлороплатини (II) (CDDP), яка має наступну формулу:



Термін "карбоплатин" відноситься до сполуки цис-діаміно(1,1-циклобутандикарбоксилато)платини(II), яка має наступну формулу:



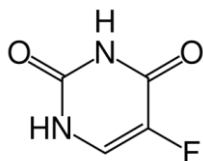
Термін "оксаліплатин" відноситься до сполуки платини, яка утворює комплекс із діаміноциклогексаном, і яка має наступну формулу:



Зокрема, термін "оксалиплатин" відноситься до сполуки [(1R, 2R)-циклогексан-1,2-діамін](етандіоато-О, О')платина(II). Оксалиплатин для ін'єкцій також продається під торговою маркою елоксатин.

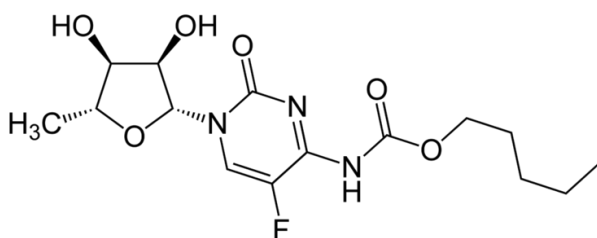
5 Термін "нуклеозидний аналог" відноситься до структурного аналога нуклеозида, включаючи й аналог пурину й аналог піримідину. Зокрема, термін "нуклеозидний аналог" відноситься до похідних фторпіримідину, які включають фторурацил і його проліки.

10 Термін "фторурацил" або "5-фторурацил" (5-FU або f5U) (продається під торговими марками Адруцил, Сагас, Ефудикс, Ефудекс і Флюороплекс) відноситься до сполуки, яка є аналогом піримідину, і яка має наступну формулу:



Зокрема, термін відноситься до сполуки 5-фтор-1Н-піримідин-2,4-діон.

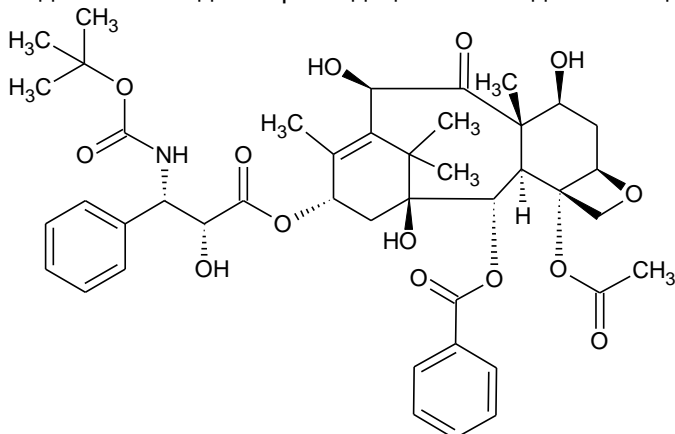
15 Термін "капецитабін" (Xeloda, Roche) відноситься до хіміотерапевтичного засобу, який є проліками, які перетворюється на 5-FU у тканинах. Капецитабін може вводитися перорально й має наступну формулу:



Зокрема, термін відноситься до сполуки пентил [1-(3,4-дигідрокси-5-метилтетрагідрофуран-2-іл)-5-фтор-2-оксо-1Н-піримідин-4-іл]карбамат.

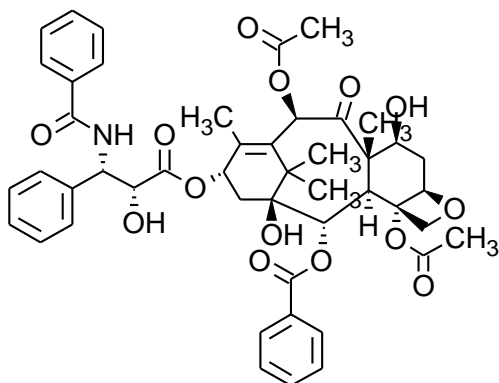
20 Таксани представляють клас дитерпенових сполук, які спочатку були отримані із природних джерел, таких як рослини роду Taxus, а деякі були синтезовані штучно. Основним механізмом дії лікарських препаратів класу таксанів є порушення функції мікротрубочок, і в такий спосіб інгібування процесу клітинного поділу. Таксани включають доцетаксел (таксотер) і паклітаксел (таксол).

Згідно з винаходом термін "доцетаксел" відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:



25

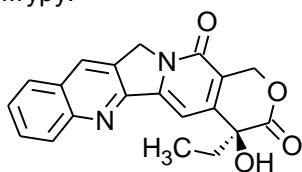
Згідно з винаходом термін "паклітаксел" відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:



Згідно з винаходом термін "аналог камптотецину" відноситься до похідних сполуки камптотецину (CPT; (S)-4-етил-4-гідрокси-1H-пірано[3',4':6,7]індолізино [1,2-b] хінолін-3,14-(4H, 12H)-діон). Бажано, термін "аналог камптотецину" відноситься до сполук, які містять наступну

5

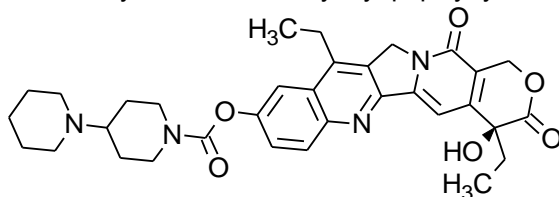
структуру:



Згідно з винаходом кращими аналогами камптотецину є інгібітори ферменту ДНК-топоізомерази I (topo I). Кращими аналогами камптотецину згідно з винаходом є іринотекан і топотекан.

10

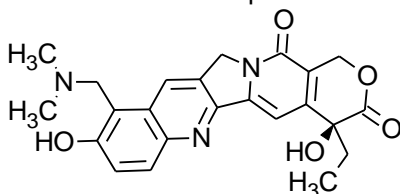
Іринотекан є лікарським засобом, який запобігає розкручуванню ДНК шляхом інгібування топоізомерази I. З погляду хімії, він є напівсинтетичним аналогом природного алкалоїду камптотецину, який має наступну формулу:



Зокрема, термін "іринотекан" відноситься до сполуки (S)-4,11-диетил-3,4,12,14-тетрагідро-4-гідрокси-3,14-діоксо-1H-пірано[3'',4'':6,7]-індолізино[1,2-b]хінолін-9-іл-[1,4'-біпиперидин]-1'-карбоксилат.

15

Топотекан є інгібітором топоізомерази, який має формулу:



Зокрема, термін "топотекан" відноситься до сполуки (S)-10-[(диметиламіно)метил]-4-етил-4,9-дигідрокси-1H-пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-3,14(4H, 12H)-діон моногідрохлорид.

20

Згідно з винаходом засіб, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, може бути хіміотерапевтичним засобом, зокрема, хіміотерапевтичним засобом, визнаним у протипухлинній терапії, може бути частиною комбінації лікарських засобів, такої як комбінація лікарських засобів, загальноприйнята для застосування при лікуванні раку. Такою комбінацією лікарських засобів може бути комбінація лікарських засобів, які використовуються у хіміотерапії, і може бути комбінація лікарських засобів, які використовуються у хіміотерапевтичному режимі, обраному із групи, яка складається з EOX хіміотерапії, ECF хіміотерапії, ECX хіміотерапії, EOF хіміотерапії, FLO хіміотерапії, FOLFOX хіміотерапії, FOLFIRI хіміотерапії, DCF хіміотерапії й FLOT хіміотерапії.

25

30

Комбінація лікарських засобів, які використовуються у режимі EOX хіміотерапії, включає епірубіцин, оксалиплатин і капецитабін. Комбінація лікарських засобів, які використовуються у режимі ECF хіміотерапії, включає епірубіцин, цисплатин і 5-фторурацил. Комбінація лікарських засобів, які використовуються у режимі ECX хіміотерапії, включає епірубіцин, цисплатин і

капецитабін. Комбінація лікарських засобів, які використовуються у режимі EOF хіміотерапії, включає епірубіцин, оксаліплатин і 5-фторурацил.

Епірубіцин звичайно призначають у дозі 50 мг/м², цисплатин у дозі 60 мг/м², оксаліплатин у дозі 130 мг/м², тривала венозна інфузія 5-фторурацилу в дозі 200 мг/м²/день і перорально капецитабін 625 мг/м² два рази на день, усього вісім 3-тижневих циклів.

Комбінація ліків, які використовуються у режимі хіміотерапії FLO, включає 5-фторурацил, фолінову кислоту й оксаліплатин (зазвичай 5-фторурацил 2,600 мг/м² 24-годинна інфузія, фолінова кислота 200 мг/м² і оксаліплатин 85 мг/м², кожні 2 тижні).

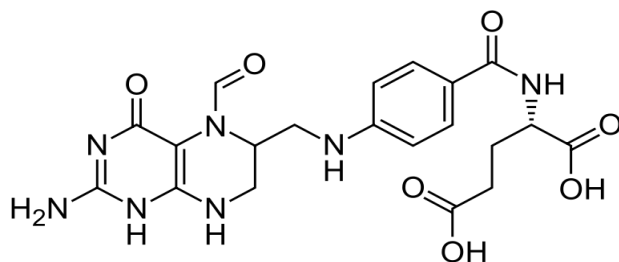
FOLFOX – це режим хіміотерапії, який включає фолінову кислоту (лейковорин), 5-фторурацил й оксаліплатину. Рекомендований режим дозування кожні два тижні виглядає наступним чином: День 1: Оксаліплатин 85 мг/м², внутрішньовенна (IV) інфузія й лейковорин 200 мг/м² IV інфузія, потім 5-FU 400 мг/м² IV уведення, потім 5-FU 600 мг/м² IV уведення у вигляді 22-годинного безперервного уливання; День 2: Лейковорин 200 мг/м² IV уливання протягом 120 хвилин, потім 5-FU 400 мг/м² IV уведення в протягом 2-4 хвилин, потім 5-FU 600 мг/м² IV уливання у вигляді 22-годинного безперервного уливання.

Комбінація ліків, які використовуються у режимі хіміотерапії FOLFIRI, включає 5-фторурацил, лейковорин і іринотекан.

Комбінація ліків, які використовуються у режимі хіміотерапії DCF, включає доцетаксел, цисплатин і 5-фторурацил.

Комбінація ліків, які використовуються у режимі хіміотерапії FLOT, включає доцетаксел, оксаліплатин, 5-фторурацил і фолінову кислоту.

Термін "фолінова кислота" або "лейковорин" відноситься до сполуки, яка використовується в синергійній комбінації з хіміотерапевтичним препаратом 5-фторурацилом. Фолінова кислота має наступну формулу:



Зокрема, термін відноситься до сполуки (2S)-2-[[4-[(2-аміно-5-форміл-4-оксо-5,6,7,8-тетрагідро-1H-птеридин-6-іл)метиламіно]бензоїл]аміно]пентандіова кислота.

В одному варіанті здійснення даного винаходу стандартна хіміотерапія відповідно до EOX режиму у комбінації з антитілом, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зокрема IMAV362, проводиться максимум протягом 8 циклів. Дози й режими можуть бути такими, як зазначено далі:

- 50 мг/м² епірубіцину вводиться внутрішньовенно (i.v.) у вигляді 15 хвилинного уливання в 1 день кожного циклу протягом EOX фази.

- 130 мг/м² оксаліплатину вводиться i.v. у вигляді 2-годинного уливання в 1 день кожного циклу протягом EOX фази.

- 625 мг/м² капецитабіну призначається для перорального приймання (p.o.) два рази на день протягом 21 дня ранком і ввечері, починаючи з вечора першого дня кожного циклу протягом EOX фази.

- 1000 мг/м² антитілу вводиться i.v. у вигляді 2-годинного уливання в 1 день циклу 1. Після цього 600 мг/м² антитілу вводиться i.v. у вигляді 2-годинного уливання в 1 день кожного наступного циклу після завершення уливання оксаліплатину.

- Після завершення хіміотерапії пацієнт продовжує приймання 600 мг/м² антитілу у вигляді 2-годинного уливання кожні 3 або 4 тижня.

В одному варіанті здійснення даного винаходу стандартна хіміотерапія відповідно до EOX-режиму у комбінації з ZA/IL-2 і антитілом, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зокрема IMAV362, проводиться аж до 8 циклів (24 тижня).

Термін "антиген" має відношення до агента, такого як білок або пептид, який містить епітоп, на який спрямована або повинна бути спрямована імунна відповідь. У кращому варіанті здійснення антиген є асоційованим з пухлиною антигеном, таким як CLDN18.2, тобто, компонентом ракових клітин, які походять з цитоплазми, клітинної поверхні й клітинного ядра, зокрема, тих антигенів, які виробляються, переважно у великій кількості, внутрішньоклітинно або як поверхневі антигени на ракових клітинах.

У контексті даного винаходу термін "асоційований з пухлиною" передусім має відношення до білків, які за нормальних умов специфічно експресуються в обмеженому числі тканин і/або органів або під час конкретних стадій розвитку й експресуються або ненормально експресуються в одній або більше пухлинних або ракових тканинах. У контексті даного винаходу асоційований з пухлиною бажано пов'язаний із клітинною поверхнею ракової клітини й бажано не експресується або тільки вкрай рідко експресується в нормальних тканинах.

Термін "епітоп" відноситься до антигенної детермінанти в молекулі, тобто частини в молекулі, яка розпізнається імунною системою, наприклад, яка розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи є окремими, тривимірними ділянками на антигені, які розпізнаються імунною системою. Звичайно епітопи складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, але не із другими, втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Епітоп білка, такого як CLDN18.2, бажано містить безперервну або переривчасту частину зазначеного білка й переважно становить від 5 до 100, бажано від 5 до 50, ще краще від 8 до 30, найкраще від 10 до 25 амінокислот у довжину, наприклад, бажано епітоп може мати 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 амінокислот у довжину.

Термін "антитіло" відноситься до глікопротеїну, який містить, щонайменше, два важкі (H) ланцюги й два легкі (L) ланцюги, взаємо-з'єднані дисульфідними зв'язками, і включає будь-яку молекулу, яка містить антигензв'язуючу ділянку. Термін "антитіло" включає моноклональні антитіла й фрагменти або похідні антитіл, включаючи, без обмеження, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, наприклад, scFv's і антигензв'язуючі фрагменти антитіл, такі як Fab і Fab¹ фрагменти, а також включає всі рекомбінантні форми антитіл, наприклад, антитіла, експресовані в прокаріотах, неглікозильовані антитіла й будь-які антигензв'язуючі фрагменти антитіл і похідні, як описується тут. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (позначається в описі VH) і константної області важкого ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (позначається в описі VL) і константної області легкого ланцюга. Області VH і VL можна додатково розділити на області гіперваріабельності (гіпермінливі), які називаються гіперваріабельними ділянками (CDR), і які чергуються з ділянками, які є більш консервативними, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, що розташовуються від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого й легкого ланцюга містять домен зв'язування, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканиною або факторами "хазяїна", включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Антитіла, описані в даному документі, можуть бути людськими антитілами. Використаний в описі термін "людське антитіло" включає антитіла, які мають варіабельну й константну області, джерелом походження яких є людські зародкові послідовності імуноглобуліну. Людські антитіла, описані в даному документі, можуть містити залишки амінокислот, не кодовані людськими зародковими послідовностями імуноглобуліну (наприклад, мутації, введені шляхом випадкового або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або шляхом соматичних мутацій *in vivo*).

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до молекули, яка має ділянку зв'язування антигену, отриману в основному від імуноглобуліну такого виду тварин, який не є людиною, при цьому інша частина молекули імуноглобуліну ґрунтується на структурі й/або послідовності імуноглобуліну людини. Ділянка зв'язування антигену може містити або повні варіабельні домени, приєднані до константних доменів, або тільки гіперваріабельні ділянки (CDR), приєднані до придатних каркасних ділянок у варіабельних доменах. Ділянки зв'язування антигену можуть бути дикого типу або модифікованими за допомогою однієї або більше амінокислотних замінів, наприклад, модифікованими для того, щоб бути більш подібними на людський імуноглобулін. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають усі CDR-послідовності (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі шість CDR від мишачого антитіла). Інші форми мають один або більше CDR, змінених у порівнянні з первинним антитілом.

Термін "химерне антитіло" відноситься до антитіл, у яких одна частина кожної з амінокислотних послідовностей важкого й легкого ланцюгів є гомологічною до відповідних послідовностей в антитілі, отриманому від конкретного виду або яке належить до певного класу, тоді як інший сегмент ланцюга є гомологічним до відповідної послідовності іншого виду. Звичайно варіабельна ділянка й легкого й важкого ланцюгів копіює варіабельні ділянки антитіл,

отримані від одного виду ссавців, тоді як константні частини є гомологічними до послідовностей антитіл, отриманих від іншого виду. Однією очевидною перевагою таких химерних форм є те, що варіабельну ділянку можна легко одержати з відомих на цей час джерел, використовуючи легкодоступні В-клітини або гібридами від організмів-хазяїв, які не є людиною, у комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, із препаратів клітин людини. При цьому, варіабельна область має перевагу, яка полягає в легкості одержання, а специфічність не підпадає під вплив джерела, константна область, будучи людською, менш імовірно викличе імунну відповідь у людини при введенні антитіл, ніж викликала б константна область із джерела, яке не є людиною. Однак дане визначення не обмежується цим окремим прикладом.

Терміни "антигензв'язуюча ділянка" антитіла (або просто "ділянка зв'язування") або "антигензв'язуючий фрагмент" антитіла (або просто "зв'язувальний фрагмент") або подібні терміни відносяться до одного або більше фрагментів антитіла, які зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Показано, що антигензв'язуюча функція антитіла може здійснюватися фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплені терміном "антигензв'язуюча ділянка" антитіла, включають (i) Fab фрагменти, одновалентні фрагменти, які складаються із VL, VH, CL і CH доменів; (ii) F(ab')₂ фрагменти, двовалентні фрагменти, що містять два Fab-фрагменти, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd фрагменти, які складаються із VH і CH доменів; (iv) Fv фрагменти, які складаються із VL і VH доменів одноланцюгових антитіл, (v) dAb фрагменти (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546), які складаються із VH домена; (vi) ізольовані гіперваріабельні ділянки (CDR) і (vii) комбінації двох або більше ізольованих CDR, які необов'язково можуть з'єднуватися синтетичним лінкером. Крім того, хоча два домена Fv фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати, використовуючи рекомбінантні методи, за допомогою синтетичних лінкерів, що дає їм можливість формувати єдиний білковий ланцюг, у якому VL і VH області розташовуються парами, щоб утворювати одновалентні молекули (відомі як одноланцюговий Fv (scFv); дивися, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також охоплюються терміном "антигензв'язуюча ділянка" антитіла. Додатковим прикладом є домен-зв'язувальні гібридні імуноглобуліни, які містять (i) поліпептидний домен зв'язування, який приєднується до шарнірної області імуноглобуліну, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до шарнірної області, і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до константної області CH₂. Зв'язувальний домен поліпептиду може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Домен-зв'язувальні імуноглобулінові гібридні білки додатково розкриваються в США 2003/0118592 і США 2003/0133939. Ці фрагменти антитіл одержують за допомогою звичайних методів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, при цьому фрагменти зазнають скринінгу щодо їх придатності, так само, як і інтактні антитіла.

Термін "біспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид або білковий або пептидний комплекс, який має дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні, і (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини. Термін "мультиспецифічна молекула" або "гетероспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид або білковий або пептидний комплекс, який має більш ніж дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні й (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини й (c), щонайменше, з одним іншим компонентом. Відповідно, винахід включає, але не обмежується цим, біспецифічні, триспецифічні, тетраспецифічні та інші мультиспецифічні молекули, спрямовані на CLDN18.2 і на інші мішені, такі як Fc-рецептори на ефektorних клітинах. Термін "біспецифічні антитіла" також включає діабоди (diabodies). Діабоди є двовалентними біспецифічними антитілами, у яких VH і VL домени експресуються на одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є занадто коротким, щоб дати можливість розташовуватися парами між двома доменами на одному й тому ж ланцюзі, таким чином, змушуючи домени утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга й породжуючи дві антигензв'язуючі ділянки (дивися, наприклад, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Антитіло може бути кон'югованим з терапевтичною молекулою або агентом, таким як цитотоксин, лікарським засобом (наприклад, імуносупресорним засобом) або радіоізотопом. Цитотоксин або цитотоксичний засіб включає будь-який засіб, який завдає шкоди й, зокрема, знищує клітини. Приклади включають таксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидіум бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин,

даунорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин та їх аналоги або гомологи. Придатні для утворення кон'югатів з антитілами терапевтичні засоби включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі засоби (наприклад, мехлоретамін, тіотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусулфан, дибромманітол, стрептозотозин, мітоміцин C, і цис-дихлородиамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше даунорубіцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC), і антимітотичні засоби (наприклад, вінкристин і вінбластин). У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є цитотоксичним засобом або радіотоксичним засобом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є імуносупресорним засобом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є GM-CSF. У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є доксорубіцином, цисплатином, блеоміцином, сульфатом, кармустином, хлорамбуцилом, циклофосфамідом або рицином A.

Антитіла також можуть бути кон'юговані з радіоізотопом, наприклад, йодом-131, ітрієм-90 або індієм-111, для одержання цитотоксичних радіофармацевтичних засобів.

Кон'югати антитіл запропоновані винаходом можна використовувати для того, щоб модифікувати дану біологічну відповідь, при цьому лікарська частка (drug moiety) не повинна розглядатися як така, що обмежує застосування класичних хімічних терапевтичних лікарських засобів. Наприклад, лікарська частка може бути білком або поліпептидом, які проявляють бажану біологічну активність. Такий білок може включати, наприклад, ферментативно активний токсин, або його активний фрагмент, такий як абрин, рицин A, екзотоксин синьої палички або дифтерійний токсин; білок, такий як фактор некрозу пухлини або інтерферон-γ; або модифікатори біологічної відповіді такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF") або інші фактори росту.

Методи кон'югування такої терапевтичної частки з антитілом добре відомі, дивися, наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) і Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

При використанні в описі виразу антитіло "походить від" окремої зародкової послідовності, якщо антитіло отримане із системи шляхом імунізації тварини або шляхом скринінга бібліотеки генів імуноглобулінів, і при цьому обране антитіло є, щонайменше, на 90 %, більш бажано, щонайменше, на 95 %, навіть ще краще, щонайменше, на 96 %, 97 %, 98 %, або 99 % аналогічним до послідовності амінокислот у порівнянні з послідовністю амінокислот, яка кодується зародковим геном імуноглобуліну. Як правило, антитіло, джерелом походження якого є окрема зародкова послідовність, буде демонструвати не більше ніж 10 амінокислотних відмінностей, більш бажано, не більше ніж 5, або навіть ще краще, не більше, ніж 4, 3, 2 або 1 амінокислотну відмінність від амінокислотної послідовності, яка кодується зародковим геном імуноглобуліну.

Термін "гетероантитіла", як він використовується в описі відноситься до двох або більше антитіл, їх похідних або антигензв'язуючих ділянок, з'єднаних разом, щонайменше, дві з яких мають різні специфічності. Ці різні специфічності включають специфічність зв'язування для Fc-рецептора на ефекторній клітині й специфічність зв'язування для антигену або епітопа на клітині-мішені, наприклад, пухлинній клітині.

Описані в даному документі антитіла можуть бути моноклональними антитілами. Термін "моноклональне антитіло", як він використовується в описі відноситься до препарату молекул антитіл з однаковим молекулярним складом. Моноклональне антитіло має одну специфічність зв'язування й спорідненість до окремого епітопу. В одному варіанті здійснення моноклональні антитіла виробляються за допомогою гібридоми, яка включає В-клітину, отриману від тварини, яка не є людиною, наприклад, миші, з'єднану з імпортованою клітиною.

Описані в даному документі антитіла можуть бути рекомбінантними антитілами. Термін "рекомбінантне антитіло", як він використовується в описі включає всі антитіла, які виходять, експресуються, створюються або виділяються за допомогою рекомбінантних способів, наприклад, (а) антитіла, виділені із тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною або транскромосомною відносно генів імуноглобулінів або гібридами, отриманої з них, (b) антитіла, виділені із клітини-хазяїна, трансформованої для того, щоб вона експресувала антитіла, наприклад, із трансфектоми, (с) антитіла, виділені з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних антитіл, і (d) антитіла отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які стосуються сплайсинг послідовностей генів імуноглобулінів з іншими ДНК-послідовностями.

Джерелом походження описаних в даному документі антитіл можуть бути різні види, включаючи, але не обмежуючись цим, мишу, пацюка, кролика, морську свинку й людину.

Описані в даному документі антитіла включають поліклональні й моноклональні антитіла й включають IgA, такі як IgA1 або IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, і IgD антитіла. У різних варіантах здійснення антитіло є IgG1 антитілом, конкретніше IgG1, каппа або IgG1, лямбда ізотипом (тобто IgG1, κ , λ), IgG2a антитілом (наприклад, IgG2a, κ , λ), IgG2b антитілом (наприклад, IgG2b, κ , λ), IgG3 антитілом (наприклад, IgG3, κ , λ) або IgG4 антитілом (наприклад, IgG4, κ , λ).

Термін "трансфектома", як він використовується в описі включає рекомбінантні еукаріотичні клітини-хазяї, які експресують антитіло, такі як клітини CHO, клітини NS/0, клітини HEK293, клітини HEK293T, рослинні клітини або клітини грибів, включаючи клітини дріжджів.

Термін "гетерологічне антитіло", як він використовується в описі, визначається з погляду трансгенного організму, який продукує таке антитіло. Цей термін відноситься до антитіла, яке має амінокислотну послідовність або яке кодується нуклеїновокислотною послідовністю, яка відповідає послідовності, виявленій в організмі, який не містить трансгенний організм, і як правило, отриманому від іншого виду, ніж трансгенний організм.

Термін "гетерогібридне антитіло", як він використовується в описі, відноситься до антитіла, яке має легкий і важкий ланцюги від різних організмів. Наприклад, антитіло, яке має людський важкий ланцюг, з'єднаний з мишачим легким ланцюгом, є гетерогібридним антитілом.

Винахід включає всі антитіла й похідні антитіл, описані тут, які для цілей винаходу охоплюються терміном "антитіло". Термін "похідні антитіл" відноситься до будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад, кон'югату антитіла й іншого агента або антитіла або фрагмента антитіла.

Описані тут антитіла бажано є ізольованими. Термін "ізольоване антитіло", як він використовується в описі, відноситься до антитіла, яке в основному є вільним від інших антитіл, які мають інші антигенні специфічності (наприклад, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN18.2, є в основному вільним від антитіл, які специфічно зв'язують антигени, відмінні від CLDN18.2). Однак, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом людського CLDN18.2, може мати перехресну реактивність до інших споріднених антигенів, наприклад, від інших видів (наприклад, видових гомологів CLDN18.2). Більше того, ізольоване антитіло може бути в основному вільним від іншого клітинного матеріалу й/або хімічних речовин. В одному варіанті здійснення винаходу комбінація "ізольованих" моноклональних антитіл має відношення до антитіл, які мають різні специфічності й об'єднані у чітко визначену композицію або суміш.

Термін "зв'язування" згідно з винаходом, переважно має відношення до специфічного зв'язування.

Згідно із даним винаходом антитіло є здатним зв'язуватися з певною мішенню, якщо воно має значну спорідненість до зазначеної певної мішені й зв'язується із зазначеною певною мішенню в стандартних методах дослідження. "Спорідненість" або "спорідненість зв'язування" часто оцінюється рівноважною константою дисоціації (K_D). Бажано термін "значна спорідненість" відноситься до зв'язування з певною мішенню з константою дисоціації (K_D) 10^{-5} М або нижче, 10^{-6} М або нижче, 10^{-7} М або нижче, 10^{-8} М або нижче, 10^{-9} М або нижче, 10^{-10} М або нижче, 10^{-11} М або нижче або 10^{-12} М або нижче.

Антитіло не є здатним (значно) зв'язуватися з мішенню, якщо воно не має значної спорідненості із зазначеною мішенню й не зв'язується значною мірою, зокрема, не зв'язується, в тій мірі, яка піддається виявленню, із зазначеною мішенню за стандартних методів аналізу. Бажано антитіло не зв'язується, в тій мірі, яка піддається виявленню із зазначеною мішенню, якщо воно присутнє у концентрації до 2, бажано до 10, ще краще, до 20, зокрема 50 або 100 мкг/мл або вище. Бажано антитіло не має значної спорідненості до мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_D , який є, щонайменше, в 10 разів, 100 разів, 10^3 разів,

10^4 разів, 10^5 разів або 10^6 разів вищим, ніж K_D зв'язування з певною мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло, становив 10^{-7} М, то тоді K_D зв'язування з мішенню, до якої антитіло не має значної спорідненості, становив би, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Антитіло є специфічним для зазначеної мішені, якщо воно здатне зв'язуватися із зазначеною певною мішенню, тоді як воно не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, тобто має незначну спорідненість до інших мішеней і незначно зв'язується з іншими мішенями за стандартних методів аналізу. Згідно з винаходом антитіло є специфічним до CLDN18.2, якщо воно здатне зв'язуватися з CLDN18.2, але (практично) не здатне зв'язуватися з іншими мішенями. Бажано, антитіло є специфічним до CLDN18.2, якщо спорідненість і зв'язування з іншими мішенями не перевищує значної спорідненості до або зв'язування з білками, неспорідненими з CLDN18.2, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, людський сироватковий альбумін (HSA) або трансмембранні білки, які не є клаудинами, такі як молекули МНС або рецептор трансферину або будь-який інший специфічний поліпептид. Бажано антитіло є специфічним для визначеної мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_D , який є, щонайменше, в 10 разів, 100 разів, 10^3 разів, 10^4 разів, 10^5 разів або 10^6 разів меншим, ніж K_D зв'язування з мішенню, яка не є специфічною. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, яка є специфічною становить 10^{-7} М, то тоді K_D зв'язування з мішенню, яка не є специфічною, мабуть, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Зв'язування антитіла з мішенню можна визначити експериментально, використовуючи будь-який придатний метод, дивися, наприклад, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Jam's Immunology, W. H. Freeman i Company New York, N Y (1992), і описані тут методи. Спорідненість можна легко визначити за допомогою звичайних методів, таких як рівноважний діаліз; за допомогою приладу Biorad 2000, використовуючи загальні методики, запропоновані виробником; за допомогою радіоімунологічного аналізу з використанням міченого радіоактивним ізотопом цільового антигену або іншими методами, відомими фахівцям. Дані щодо спорідненості можна проаналізувати, наприклад, за допомогою методу Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Величина, яка характеризує спорідненість окремої взаємодії антитіло-антиген може варіювати, якщо вимірювання проводилося за різних умов, наприклад, концентрації солі, рН. Таким чином, вимірювання спорідненості й інших параметрів зв'язування антигену, наприклад, K_D , IC_{50} , бажано проводяться за допомогою стандартизованих розчинів антитіла й антигену й стандартизованого буфера.

Термін "ізотип", як він використовується в описі, відноситься до класу антитіл (наприклад, IgM або IgG 1), які кодуються генами константної області важкого ланцюга.

Термін "перемикання ізотипа", як він використовується в описі, відноситься до явища, за допомогою якого клас або ізотип антитіла змінюється від одного класу Ig до одного з інших класів Ig.

Термін "природний", як він використовується в описі, стосовно об'єкта відноситься до тієї обставини, що об'єкт може бути знайдений у природі. Наприклад, послідовність поліпептиду або полінуклеотиду, яка є присутньою в організмі (включаючи віруси), і яка може бути виділеною із природного джерела, і яка не була навмисно модифікована людиною в лабораторії, є природною.

Термін "перегрупувана", як він використовується в описі, відноситься до конфігурації важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобулінового локусу, у якому V сегмент розташовується безпосередньо поруч із D-J або J сегментом у конформації, що кодує фактично повний VH або VL домен, відповідно. Перегрупуваний генний локус імуноглобуліну (антитіла) може бути встановлений шляхом порівняння із зародковою ДНК; перегрупуваний локус буде мати, щонайменше, один рекомбінований семичленний/дев'ятичленний гомологічний елемент.

Терміни "перегрупування" або "зародкова конфігурація", як вони використовуються в описі, стосовно V сегмента відноситься до конфігурації, у якій V сегмент є нерекомбінованим для того, щоб бути безпосередньо поруч із D або J сегментом.

Згідно з винаходом антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, здатним зв'язуватися з епітопом, присутнім на CLDN18.2, переважно епітопом, розташованим у межах позаклітинних доменів CLDN18.2, зокрема першому позаклітинному домені, бажано о в положеннях амінокислот від 29 до 78 CLDN18.2. В окремих варіантах здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, здатним зв'язуватися з (i) епітопом на CLDN18.2, не присутнім на CLDN18.1, бажано SEQ ID NO: 3, 4 і 5, (ii) епітопом, розташованим на CLDN18.2 – петля1, бажано SEQ ID NO: 8, (iii) епітопом, розташованим на CLDN18.2-петля2, бажано SEQ ID NO: 10, (iv) епітопом, розташованим на CLDN18.2-петляD3, бажано SEQ ID NO:

11, (v) епітопом, який містить CLDN18.2-петлю1 і CLDN18.2-петлюD3, або (vi) неглікозильованим епітопом, розташованим на CLDN18.2-петляD3, бажано SEQ ID NO: 9.

Згідно з винаходом антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано є антитілом, здатним зв'язуватися CLDN18.2, але не з CLDN18.1. Бажано, антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним до CLDN18.2. Бажано, антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, експресованим на клітинній поверхні. В окремих кращих варіантах здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з нативними епітопами CLDN18.2, присутніми на поверхні живих клітин. Бажано, антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з одним або більше пептидами, обраними із групи, яка складається з SEQ ID №: 1, 3-11, 44, 46, і 48-50. Бажано, антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним для згаданих вище білків, пептидів або імуногенних фрагментів або їх похідних. Антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, може бути отримане способом, який включає стадію імунізації тварини білком або пептидом, який містять амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID №: 1, 3-11, 44, 46, і 48-50, або нуклеїнову кислоту або клітину-хазяїна, яка експресує зазначений білок або пептид. Бажано, антитіло зв'язується з раковими клітинами, зокрема клітинами згаданих вище типів раку й, бажано, практично не зв'язується з нераковими клітинами.

Бажано, зв'язування антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, із клітинами, які експресують CLDN18.2, викликає або опосередковує знищення клітин, які експресують CLDN18.2. Клітини, які експресують CLDN18.2, бажано є раковими клітинами, і, зокрема, їх вибирають із групи, яка складається зі злоякісних клітин раку шлунка, стравоходу, підшлункової залози, легенів, яєчника, товстої кишки, печінки, голови і шиї й жовчного міхура. Бажано, антитіло викликає або опосередковує знищення клітин, індуючи один або більше із поміж опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC) лізису, апоптозу й інгібування проліферації клітин, які експресують CLDN18.2. Бажано, ADCC-опосередкований лізис відбувається в присутності ефektorних клітин, які в окремих варіантах здійснення вибирають із групи, яка складається з моноцитів, мононуклеарних клітин, НК-клітин і PMNs. Інгібування проліферації клітин можна вимірювати *in vitro* шляхом визначення проліферації клітин методом аналізу із застосуванням бромдезоксиридину (5-бром-2-дезоксиридин, BrdU). BrdU є синтетичним нуклеозидом, аналогом тимідину, і може вбудовуватися в знову синтезовану ДНК клітин, які відтворюються шляхом клітинного поділу (у ході S фази клітинного циклу), замінюючи тимідин під час реплікації ДНК. Виявлення "включеної" хімічної речовини за допомогою, наприклад, антитіл, специфічних до BrdU, указує на клітини, які активно відтворювали свою ДНК.

У кращих варіантах здійснення описані в даному документі антитіла можуть бути охарактеризовані за однією або більше із наступних властивостей:

- a) специфічність до CLDN18.2;
- b) афінність зв'язування з CLDN18.2 близько 100 нМ або менше, бажано, близько 5-10 нМ або менше і ще краще, близько 1-3 нМ або менше,
- c) здатність викликати або опосередковувати CDC CLDN18.2-позитивних клітин;
- d) здатність викликати або опосередковувати ADCC CLDN18.2-позитивних клітин;
- e) здатність інгібувати ріст CLDN18.2-позитивних клітин;
- f) здатність викликати апоптоз CLDN18.2-позитивних клітин.

В окремому кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, виробляється гібридомою, депонованою в DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; new address: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany), яка має наступне позначення й обліковий номер:

- a. 182-D1106-055, обліковий номер DSM ACC2737, депонована 19 жовтня 2005
- b. 182-D1106-056, обліковий номер DSM ACC2738, депонована 19 жовтня 2005
- c. 182-D1106-057, обліковий номер DSM ACC2739, депонована 19 жовтня 2005
- d. 182-D1106-058, обліковий номер DSM ACC2740, депонована 19 жовтня 2005
- e. 182-D1106-059, обліковий номер DSM ACC2741, депонована 19 жовтня 2005
- f. 182-D1106-062, обліковий номер DSM ACC2742, депонована 19 жовтня 2005
- g. 182-D1106-067, обліковий номер DSM ACC2743, депонована 19 жовтня 2005
- h. 182-D758-035, обліковий номер DSM ACC2745, депонована 17 листопада 2005
- i. 182-D758-036, обліковий номер DSM ACC2746, депонована 17 листопада 2005
- j. 182-D758-040, обліковий номер DSM ACC2747, депонована 17 листопада 2005
- k. 182-D1106-061, обліковий номер DSM ACC2748, депонована 17 листопада 2005

l. 182-D1106-279, обліковий номер DSM ACC2808, депонована 26 жовтня 2006
 m. 182-D1106-294, обліковий номер DSM ACC2809, депонована 26 жовтня 2006
 n. 182-D1106-362, обліковий номер DSM ACC2810, депонована 26 жовтня 2006.

Кращими антитілами згідно з винаходом є антитіла, які виробляються або одержані за допомогою вищезгаданих гібридом; тобто 37G11 у випадку 182-D1106-055, 37H8 у випадку 182-D1106-056, 38G5 у випадку 182-D1106-057, 38H3 у випадку 182-D1106-058, 39F11 у випадку 182-D1106-059, 43A11 у випадку 182-D1106-062, 61C2 у випадку 182-D1106-067, 26B5 у випадку 182-D758-035, 26D12 у випадку 182-D758-036, 28D10 у випадку 182-D758-040, 42E12 у випадку 182-D1106-061, 125E1 у випадку 182-D1106-279, 163E12 у випадку 182-D1106-294, і 175D10 у випадку 182-D1106-362; та їх химерних й гуманізованих форм.

Кращі химерні антитіла та їх послідовності показані в наступній таблиці.

	клон	mab	ізотип	варіабельна область	химерне антитіло
Важкий ланцюг	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:14
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:15
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:16
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:18
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:17
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:19
Легкий ланцюг	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:21
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:20
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:22
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:25
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:24
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:23
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:26
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:27
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:28

У кращих варіантах здійснення антитіла, зокрема, химерні форми антитіл запропоновані винаходом, включають антитіла, які містять константну область важкого ланцюга (CH) яка включає, амінокислотну послідовність, яка походить з людської константної області важкого ланцюга, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 13, або її фрагмент. У додаткових кращих варіантах здійснення, антитіла, зокрема, химерні форми антитіл запропоновані винаходом, включають антитіла, які містять константну область легкого ланцюга (CL) яка включає, амінокислотну послідовність, яка походить з людської константної області легкого ланцюга, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 12, або її фрагмент. В окремому кращому варіанті здійснення антитіла, зокрема, химерні форми антитіл запропоновані винаходом, включають антитіла, які містять CH, яка включає амінокислотну послідовність, яка походить від людської CH, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 13, або її фрагмент, і які містять CL, яка включає амінокислотну послідовність, яка походить від людської CL, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 12, або її фрагмент.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є химерним миша/людина IgG1 моноклональним антитілом, яке містить мишачу каппа варіабельну область легкого ланцюга, людську каппа константну область легкого ланцюга алотип Km(3), мишачу варіабельну область важкого ланцюга, константну область людського IgG1, алотип G1m(3).

У деяких кращих варіантах здійснення химерні форми антитіл включають антитіла, які містять важкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID Nos: 14, 15, 16, 17, 18, 19, і її фрагмента, і/або які містять легкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID Nos: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, та її фрагмента.

У деяких кращих варіантах здійснення химерні форми антитіл включають антитіла, які містять комбінацію важких ланцюгів і легких ланцюгів, обраних з наступних можливих варіантів (i) - (ix):

(i) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 14, або її

фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 21, або її фрагмент,

(ii) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 15, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 20, або її фрагмент,

(iii) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 16, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22, або її фрагмент,

(iv) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 18, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 25, або її фрагмент,

(v) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 17, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 24, або її фрагмент,

(vi) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 23, або її фрагмент,

(vii) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 26, або її фрагмент,

(viii) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 27, або її фрагмент, і

(ix) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19, або її фрагмент, і легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 28, або її фрагмент.

Термін "фрагмент" або "фрагмент амінокислотної послідовності", як він використовується в описі, має відношення до частини послідовності антитіла, тобто послідовності, яка є послідовністю антитіла, укороченою на N- і/або C-кінцях, і яка, у тому випадку, коли вона заміняє зазначену послідовність антитіла в антитілі, зберігає здатність зв'язування зазначеного антитіла з CLDN18.2 і бажано функції зазначеного антитіла, описані тут, наприклад, CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис. Бажано, фрагмент амінокислотної послідовності містить, щонайменше, 80 %, бажано, щонайменше, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % амінокислотних залишків від зазначеної амінокислотної послідовності. Фрагмент амінокислотної послідовності, обраний із групи, яка складається з SEQ ID Nos: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 і 28, бажано має відношення до зазначеної послідовності, у якій 17, 18, 19, 20, 21, 22 або 23 амінокислоти вилучені на N-кінці.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить важкий ланцюг варіабельної області (VH), який включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID Nos: 29, 30, 31, 32, 33, 34 та їх фрагмента.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить легкий ланцюг варіабельної області (VH) який включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 та їх фрагмента.

У деяких кращих варіантах здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить комбінацію важкого ланцюга варіабельної області (VH) і легкого ланцюга варіабельної області (VL), обрану з наступних можливих варіантів (i) - (ix):

(i) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 29, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36, або її фрагмент,

(ii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 30, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 35, або її фрагмент,

(iii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 31, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37, або її фрагмент,

(iv) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 33, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 40, або її фрагмент,

(v) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 32, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 39, або її фрагмент,

(vi) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 38, або її фрагмент,

(vii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 41, або її фрагмент,

(viii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 42, або її фрагмент,

(ix) VH містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 43, або її фрагмент.

5 У кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить VH, що включає набір гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів здійснення (i) - (vi):

(i) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 14, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 14, CDR3: положення 116-125 SEQ ID NO: 14,

10 (ii) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 15, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 15, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 15,

(iii) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 16, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 16, CDR3: положення 116-124 SEQ ID NO: 16,

(iv) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 17, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 17, CDR3: 15 положення 116-126 SEQ ID NO: 17,

(v) CDR1: положення 44-51 SEQ ID NO: 18, CDR2: положення 69-76 SEQ ID NO: 18, CDR3: положення 115-125 SEQ ID NO: 18, і

(vi) CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19.

20 У кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить VL, що включає набір гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів здійснення (i) - (ix):

(i) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 20, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 20, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 20,

25 (ii) CDR1: положення 49-53 SEQ ID NO: 21, CDR2: положення 71-73 SEQ ID NO: 21, CDR3: положення 110-118 SEQ ID NO: 21,

(iii) CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 22, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 22, CDR3: положення 109-117 SEQ ID NO: 22,

(iv) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 23, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 23, CDR3: 30 положення 115-123 SEQ ID NO: 23,

(v) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 24, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 24, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 24,

(vi) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 25, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 25, CDR3: положення 115-122 SEQ ID NO: 25,

35 (vii) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 26, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 26, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 26,

(viii) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 27, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 27, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 27, і

(ix) CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 28, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 28, CDR3: 40 положення 109-117 SEQ ID NO: 28.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить комбінацію VH і VL, кожна з яких включає набір гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів здійснення (i) - (ix):

45 (i) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 14, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 14, CDR3: положення 116-125 SEQ ID NO: 14, VL: CDR1: положення 49-53 SEQ ID NO: 21, CDR2: положення 71-73 SEQ ID NO: 21, CDR3: положення 110-118 SEQ ID NO: 21,

(ii) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 15, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 15, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 20, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 20, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 20,

50 (iii) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 16, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 16, CDR3: положення 116-124 SEQ ID NO: 16, VL: CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 22, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 22, CDR3: положення 109-117 SEQ ID NO: 22,

(iv) VH: CDR1: положення 44-51 SEQ ID NO: 18, CDR2: положення 69-76 SEQ ID NO: 18, CDR3: положення 115-125 SEQ ID NO: 18, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 25, CDR2: 55 положення 76-78 SEQ ID NO: 25, CDR3: положення 115-122 SEQ ID NO: 25,

(v) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 17, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 17, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 17, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 24, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 24, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 24,

60 (vi) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 23, CDR2:

положення 76-78 SEQ ID NO: 23, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 23,

(vii) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 26, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 26, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 26,

5 (viii) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 27, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 27, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 27, і

(ix) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 28, CDR2: 10 положення 70-72 SEQ ID NO: 28, CDR3: положення 109-117 SEQ ID NO: 28.

У додаткових кращих варіантах здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано містить одну або більше гіперваріабельних ділянок (CDRs), бажано, щонайменше, CDR3 варіабельну ділянку, варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL) моноклонального антитіла до CLDN18.2, бажано 15 моноклонального антитіла до CLDN18.2, описаного в даному документі, і бажано містить одну або більше гіперваріабельних ділянок (CDRs), бажано, щонайменше, CDR3 варіабельну ділянку, варіабельних областей важкого ланцюга (VH) і/або варіабельних областей легкого ланцюга (VL), описаних тут. В одному варіанті здійснення зазначений одну або більше гіперваріабельних ділянок (CDRs) обирають із набору гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і 20 CDR3, описаних тут. В особливо кращому варіанті здійснення антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано містить гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області важкого ланцюга (VL) моноклонального антитіла до CLDN18.2, бажано моноклонального антитіла до CLDN18.2, описаного тут, і бажано містить гіперваріабельні ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельних 25 областей важкого ланцюга (VH) і/або варіабельних областей легкого ланцюга (VL), описаних тут.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке містить одну або більше CDRs, набір CDRs або комбінацію наборів CDRs, як описано тут, включає зазначені CDRs разом з їхніми проміжними 30 каркасними ділянками. Бажано, дана ділянка буде також включати, щонайменше, близько 50 % будь-якої або обох з першої й четвертої каркасних ділянок, причому, будучи на 50 % С-кінцевими 50 % першої каркасної ділянки й N-кінцевими 50 % четвертої каркасної ділянки. Створення антитіл методами рекомбінантних ДНК може призводити до введення N- або С-кінцевих залишків у варіабельні ділянки, які кодуються лінкерами, уведеними для полегшення клонування або інших стадій маніпуляції, включаючи введення лінкерів для з'єднання 35 варіабельних областей винаходу з додатковими білковими послідовностями, включаючи важкі ланцюги імуноглобулінів, інші варіабельні домени (наприклад, при одержанні діабодів) або білкові мітки.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке містить один або більше CDRs, набір CDRs або комбінацію наборів CDRs, як описано тут, містить зазначені CDRs у каркасній ділянці антитіла 40 людини.

Посилання в даному документі на антитіло, яке містить у його важкому ланцюзі конкретний ланцюг або конкретну область (ділянку) або послідовність, бажано відноситься до ситуації, у якій усі важкі ланцюги зазначеного антитіла містять зазначений конкретний ланцюг, область або послідовність. Це відповідно може бути застосовано до легкого ланцюга антитіла.

45 Термін "нуклеїнова кислота", який використовується в описі включає ДНК і РНК. Нуклеїнова кислота може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але бажано є дволанцюговою ДНК.

Згідно з винаходом термін "експресія" використовується в його найбільш загальному значенні й включає вироблення РНК або РНК і білка/пептиду. Термін також включає часткову експресію нуклеїнових кислот. Крім того, експресія може протікати тимчасово або постійно.

50 Слід ураховувати, що викладена в документі ідея у відношенні специфічних амінокислотних послідовностей, наприклад, зазначених у списку послідовностей, також має відношення до варіантів зазначених специфічних послідовностей, що призводять до утворення послідовностей, які є функціонально еквівалентними до зазначених специфічних послідовностей, наприклад, амінокислотних послідовностей, які демонструють властивості, 55 ідентичні або подібні, до властивостей специфічних амінокислотних послідовностей. Однією важливою властивістю є збереження зв'язування антитіла з його мішенню або підтвердження ефektorних функцій антитіла. Бажано, послідовність, яка є варіантом відносно специфічної послідовності, у тому випадку, коли вона заміняє специфічну послідовність в антитілі, зберігає здатність зв'язування зазначеного антитіла з CLDN18.2 і бажано функції зазначеного антитіла, 60 як описано тут, наприклад, CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис.

Фахівцям у даній галузі ясно, що послідовності CDR, гіперваріабельних і варіабельних областей можуть бути модифіковані без втрати здатності зв'язуватися з CLDN18.2. Наприклад, CDR ділянки будуть або ідентичними або високогомологічними до ділянок антитіла, визначеного в описі. Під "високогомологічним" мають на увазі, що може бути зроблено від 1 до 5, бажано від 1 до 4, наприклад від 1 до 3 замін, або 1 або 2 заміни в CDRs. Крім того, гіперваріабельні й варіабельні області можуть бути модифіковані таким чином, щоб вони демонстрували значну гомологію до областей антитіла, зокрема, розкритих в описі.

Для цілей даного винаходу "варіанти" амінокислотної послідовності включають варіанти із вставками амінокислот, варіанти з добавками амінокислот, варіанти з делеціями амінокислот і/або варіанти із замінами амінокислот. Варіанти з делеціями амінокислот, які містять делецію на N-кінці й/або C-кінці білка, також називаються N-кінцевими й/або C-кінцевими вкороченими варіантами.

Варіанти із вставкою амінокислот включають вставки однієї або двох або більше амінокислот в окрему амінокислотну послідовність. У випадку варіантів, які мають вставку, амінокислотної послідовності в окрему ділянку амінокислотної послідовності вставляється один або більше амінокислотних залишків, хоча за відповідного скринінга отриманого продукту також можна виявити випадкові вставки.

Варіанти амінокислотних добавок включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття з однією або більше амінокислотами, наприклад, з 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислотами.

Варіанти з делецією амінокислот характеризуються видаленням однієї або більше амінокислот з послідовності, наприклад, видаленням 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот. Делеції можуть відбуватися в будь-якому місці білка.

Варіанти із замінами амінокислот характеризуються, щонайменше, видаленням одного залишку в послідовності й вставкою іншого залишку на його місце. Перевага віддається модифікаціям, які перебувають у положеннях амінокислотної послідовності, які не є консервативними між гомологічними білками або пептидами, і/або замінам амінокислот на інші амінокислоти, що мають подібні властивості. Бажано амінокислотні зміни в білкових варіантах є консервативними амінокислотними змінами, тобто замінами аналогічно заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативна зміна амінокислоти має відношення до заміни однієї із родини амінокислот, які є спорідненими за структурою бічного ланцюга. Природні амінокислоти підрозділяються на чотири родини: кислі (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан) і незаряджені полярні (гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин) амінокислоти. Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються разом як ароматичні амінокислоти.

Бажано ступінь подібності, бажано ідентичності між даною амінокислотною послідовністю й амінокислотною послідовністю, яка є варіантом зазначеної даної амінокислотної послідовності, буде становити, щонайменше, близько 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 %. Ступінь подібності або ідентичності бажано надається для амінокислотної області, яка становить, щонайменше, близько 10 %, щонайменше, близько 20 %, щонайменше, близько 30 %, щонайменше, близько 40 %, щонайменше, близько 50 %, щонайменше, близько 60 %, щонайменше, близько 70 %, щонайменше, близько 80 %, щонайменше, близько 90 % або близько 100 % повної довжини еталонної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо еталонна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, ступінь подібності або ідентичності бажано надається, щонайменше, приблизно для 20, щонайменше, приблизно 40, щонайменше, приблизно 60, щонайменше, приблизно 80, щонайменше, приблизно 100, щонайменше, приблизно 120, щонайменше, приблизно 140, щонайменше, приблизно 160, щонайменше, приблизно 180 або приблизно для 200 амінокислот, бажано послідовних амінокислот. У кращих варіантах здійснення надається ступінь подібності або ідентичності до повної довжини еталонної амінокислотної послідовності. Вирівнювання для визначення ступеня подібності послідовності, бажано ідентичності послідовності, можна виконати відомими у даній галузі техніки способами, краще з використанням найкращого способу вирівнювання послідовності, наприклад, Align з використанням стандартних налаштувань, бажано EMBOS:needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Подібність послідовності" указує відсоток амінокислот, які або є ідентичними або які представляють консервативні амінокислотні заміни.

"Ідентичність послідовності" між двома амінокислотними послідовностями визначає відсоток амінокислот, які є ідентичними для даних послідовностей.

Термін "відсоток ідентичності" застосовують для позначення відсотка амінокислотних

залишків, ідентичних між двома порівнюваними послідовностями після виконання найбільш оптимального вирівнювання, цей відсоток є чисто статистичним, а відмінності між двома послідовностями розподіляються випадково й у межах їх повної довжини. Порівняння послідовностей між двома амінокислотними послідовностями звичайно здійснюється шляхом порівняння цих послідовностей після їхнього оптимального вирівнювання, зазначене порівняння проводиться за допомогою сегмента або "вікна порівняння" для того, щоб установити й порівняти локальні області подібності послідовності. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути проведене, крім способу "вручну", за допомогою алгоритму локальної гомології Smith і Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, за допомогою алгоритму локальної гомології Neddleman і Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, за допомогою методу пошуку подібності Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, або за допомогою комп'ютерних програм із застосуванням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N і TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Відсоток ідентичності вираховується шляхом визначення числа ідентичних положень між двома послідовностями при порівнянні, розділенням цього числа на число порівнюваних положень і множення отриманого результату на 100 для того, щоб одержати відсоток ідентичності між цими двома послідовностями.

Термін "трансгенна тварина" відноситься до тварини, яка має геном, що містить один або більше трансгенів, бажано трансгенів важкого й/або легкого ланцюга, або трансхромосом (або інтегрованих або неінтегрованих у природну геномну ДНК тварини), бажано здатних експресувати трансгени. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген людського легкого ланцюга й або трансген людського важкого ланцюга або трансхромосому людському важкому ланцюга, так що миша продукує людські анти-CLDN18.2 антитіла, коли вона імунізована CLDN18.2-антигеном і/або клітинами, які експресують CLDN18.2. Трансген людського важкого ланцюга може бути інтегрований у хромосомну ДНК миші, як у випадку трансгенної миші, наприклад, HuMAb миші, наприклад HCo7 або HCo12 миші, або трансген людського важкого ланцюга може бути збережений екстрахромосомно, як у випадку трансхромосомних (наприклад, KM) мишей, як описано в WO 02/43478. Такі трансгенні й трансхромосомні миші можуть бути здатні продукувати багато ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN18.2 (наприклад, IgG, IgA і/або IgE) при проведенні V-D-J рекомбінації й перемикання ізотипа.

"Зменшувати", "знижувати" або "інгібувати" при використанні в описі означає бути здатним викликати загальне зменшення, бажано на 5 % або більше, 10 % або більше, 20 % або більше, ще краще 50 % або більше й найкраще на 75 % або більше рівня, наприклад, рівня експресії або рівня проліферації клітин.

Такі терміни як "збільшення" або "посилення" бажано відносяться до збільшення або посилення, щонайменше, приблизно на 10 %, бажано, щонайменше, на 20 %, бажано, щонайменше, на 30 %, бажано, щонайменше, на 40 %, ще краще, щонайменше, на 50 %, навіть ще краще, щонайменше, на 80 %, і найкраще, щонайменше, на 100 %, щонайменше, на 200 %, щонайменше, на 500 %, щонайменше, на 1000 %, щонайменше, на 10 000 % або навіть більше.

Механізми дії mAb

Незважаючи на те, що наступний опис пропонує обговорення, стосовно механізму, який лежить в основі терапевтичної ефективності антитіл винаходу, він не повинен розглядатися як такий, що обмежує винахід яким би то не було чином.

Описані тут антитіла бажано взаємодіють із компонентами імунної системи, переважно через ADCC або CDC. Описані тут антитіла також можуть використовуватися для "цільового навантаження" (наприклад, радіоізотопами, лікарськими засобами або токсинами), для того, щоб безпосередньо вбивати пухлинні клітини, або можуть використовуватися синергічно разом із традиційними хімотерапевтичними засобами, впливаючи на пухлини за допомогою додаткових механізмів дії, включаючи протипухлинні імунні відповіді, які можуть бути порушені внаслідок побічних цитотоксичних ефектів хімотерапевтичних препаратів на Т-лімфоцити. Однак, описані тут антитіла також можуть діяти просто шляхом зв'язування з CLDN18.2 на клітинній поверхні, таким чином, наприклад, блокуючи проліферацію клітин.

Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність

ADCC описує здатність ефекторних клітин, як описано тут, зокрема, лімфоцитів, убивати клітини, при цьому необхідно, щоб клітина-мішень була бажано позначена антитілом.

Бажано ADCC спостерігається, коли антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних клітинах, а Fc-домени антитіл зв'язують Fc-рецептори (FcR) на поверхні імунних ефекторних клітин. Було встановлено кілька родин Fc-рецепторів, при цьому характерно, що специфічні популяції клітин експресують певні Fc-рецептори. ADCC можна розглядати як механізм прямого

руйнування (різного ступеню) пухлини, який призводить до презентації антигену й індукції Т-клітинних відповідей, спрямованих на пухлину. Бажано індукція ADCC *in vivo* буде призводити до Т-клітинної відповіді, спрямованої на пухлинні клітини, і відповіді антитіл хазяїна.

Комплементзалежна цитотоксичність.

Іншим способом знищення клітин, який може бути опосередкований антитілами, є CDC. Найефективнішим ізотипом для активації комплементу є IgM. Також дуже ефективними при спрямовуванні CDC класичним шляхом активації комплементу є IgG1 і IgG3. Бажано утворення комплексів антиген-антитіло в цьому каскаді призводить до "розкриття" численних місць зв'язування C1q у безпосередній близькості на CH2 доменах молекул антитіл, які беруть в цьому участь, наприклад, молекул IgG (C1q є одним із трьох субкомпонентів комплементу C1). Бажано ці "розкриті" місця зв'язування C1q перетворюють взаємодію C1q-IgG, яке до цього мало низьку спорідненість на спорідненість із високої авідністю, що запускає каскад подій, які залучають ряд інших білків комплементу, і призводить до протеолітичного вивільнення хемотаксичних/активуючих агентів, ефекторних клітин C3a і C5a. Бажано каскад комплементу кінчається утворенням мембрано-атакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, які сприяють вільному проходженню води й розчинених речовин у клітини й із клітин.

Описані в цьому документі антитіла можна одержати за допомогою ряду методів, включаючи звичайну методику одержання моноклональних антитіл, наприклад, методом гібридизації стандартних соматичних клітин Kohler і Milstein, Nature 256: 495 (1975). Незважаючи на те, що методи гібридизації соматичних клітин є кращими, у принципі можна використовувати інші методи одержання моноклональних антитіл, наприклад, шляхом вірусної або онкогенної трансформації В-лімфоцитів, або метод фагового дисплею з використанням бібліотек генів антитіл.

Кращою тваринною системою для одержання гібридом, яка секретує моноклональні антитіла, є мишача система. Одержання гібридом в миші є загальноприйнятим методом. Протоколи імунізації й методики виділення імунізованих спленоцитів для злиття добре відомі у даній галузі техніки. Клітини, що зливаються (наприклад, мишачі клітини мієломи) і процедури злиття також добре відомі.

Іншими кращими тваринними системами для одержання гібридом, які секретують моноклональні антитіла, є пацюки або кролики (наприклад, система, описана в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), дивися також Rossi et al., Am. J. Clin. 35 Pathol. 124:295(2005)).

В іншому кращому варіанті здійснення людські моноклональні антитіла можна одержати за допомогою трансгенних або трансхромосомних мишей, що несуть частини людської імунної системи, а не мишачої системи. Ці трансгенні або трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HuMAb і миші KM, відповідно, і які разом згадуються в описі як "трансгенні миші". Одержання людських антитіл у таких трансгенних мишах можна здійснити, як докладно описано для CD20 в WO2004 035607.

Іншою стратегією одержання моноклональних антитіл є пряме виділення генів, які кодують антитіла, з лімфоцитів, які продукують антитіла, наприклад, див. Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Подобиці розробки рекомбінантних антитіл дивися також в Welschof і Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 і Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Для одержання антитіл мишей можна імунізувати кон'югованими з носієм, пептидами отриманими з послідовності антигену, тобто послідовності, проти якої спрямовані антитіла, збагаченими препаратом рекомбінантно експресованого антигену або його фрагментів і/або клітинами, які експресують антиген, як описано. Альтернативно, мишей можна імунізувати ДНК, яка кодує антиген або його фрагменти. У тому випадку, коли імунізація з використанням очищеного або збагаченого препарату антигену не призводить до утворення антитіл, мишей також можна імунізувати клітинами, які експресують антиген, наприклад, клітинною лінією, щоб сприяти імунній відповіді.

Імунну відповідь можна контролювати протягом виконання протоколу імунізації, відбираючи зразки плазми й сироватки із хвостової вени або ретроорбітального кровотоку. Миші з достатнім титром імуноглобуліну можуть використовуватися для злиття клітин. Мишей можна піддавати стимуляції внутрішньоочеревинно й внутрішньовенно клітинами, які експресують антиген, за 3 дні до забою й видалення селезінки для того, щоб збільшити швидкість секретування специфічних антитіл гібридомами.

Для одержання гібридом, які продукують моноклональні антитіла, з лімфатичних вузлів або селезінки, отриманих від імунізованих мишей, можуть бути виділені клітини й злиті з придатною

іморталізованою клітинною лінією, наприклад, лінією клітин мієломи миші. Потім отримані гібридами можна відібрати за виробленням антиген-специфічних антитіл. Потім за допомогою методу ELISA можна відібрати окремі комірочки з гібридами, які секретують антитіла. За допомогою імуофлуоресценції й FACS-аналізу з використанням клітин, які експресують

антитіла, можна знову висіяти, провести відбір і позитивні за моноклональними антитілами можна субклонувати за допомогою серійного розведення. Потім стабільні субклони культивують *in vitro* у середовищі для культури тканини, щоб одержати й охарактеризувати антитіла.

Антитіла також можна одержати в клітинах-хазяїнах, таких як, трансфектоми,

використовуючи, наприклад, комбінацію методів рекомбінантних ДНК і методів трансфекції генів, добре відомих у даній галузі техніки (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Наприклад, в одному варіанті здійснення гени, які представляють інтерес(ген), наприклад, гени антитіл, можуть бути лігованими у вектор експресії, такий як еукаріотична експресуюча плазміда, наприклад, яка використовується системою експресії гена GS, розкритою в WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або інші системи експресії, добре відомі в даній галузі.

Очищена плазміда із клонованими генами антитіла може бути введена в еукаріотичну клітину-хазяїна, таку як CHO клітини (клітини яєчників китайського хом'ячка), NS/O клітини, НЕК293Т клітини або НЕК293 клітини або альтернативно інші еукаріотичні клітини, подібні до клітин рослин, грибів або дріжджів. Для введення цих генів можуть використовуватися методи, описані у даній галузі техніки, такі як електропорація, ліпофектин, ліпофектамін або інші. Після введення цих генів антитіл у клітини-хазяїни, клітини, які експресують антитіло можуть бути розпізнані й відібрані. Ці клітини є трансфектомами, які потім можна ампліфікувати і масштабувати для вироблення антитіл. Рекомбінантні антитіла можуть бути ізольовані й очищені із цих культуральних супернатантів і/або клітин.

Альтернативно, клоновані гени антитіла можуть бути експресовані в інших системах експресії, включаючи прокаріотичні клітини, такі як мікроорганізми, наприклад, *E. coli*. Більше того, антитіла можуть продукуватися в трансгенних організмах, які не є людиною, і бути присутніми, наприклад, у молоці овець і кроликів або в яйцях курей, або в трансгенних рослинах; дивися, наприклад, Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; і Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Химеризація

Мишачі моноклональні антитіла можуть використовуватися як терапевтичні антитіла для людей, у тому випадку, коли до них прикріплюється токсин, або коли їх мітять радіоактивними ізотопами. При повторному застосуванні немічені мишачі антитіла є високоімуногенними для людини, що призводить до зменшення терапевтичного ефекту. Основна імуногенність опосередкована константними областями важкого ланцюга. Імуногенність мишачих антитіл для людини можна зменшити або повністю її уникнути, якщо відповідні антитіла зробити химерними або гуманізованими. Химерні антитіла є антитілами, різні частини яких походять від різних видів тварин, наприклад, антитіла мають варіабельну область, отриману від мишачого антитіла, і константну область людського імуноглобуліну. Химеризація антитіл досягається з'єднанням варіабельних областей важкого й легкого ланцюгів мишачих антитіл з людською константною областю важкого й легкого ланцюга (наприклад, як описано Kraus et al., в *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). У кращому варіанті здійснення химерні антитіла одержують з'єднанням людської константної області каппа-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. У ще одному кращому варіанті здійснення химерні антитіла одержують з'єднанням людської константної області лямбда-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. Кращими константними областями важкого ланцюга для одержання химерних антитіл є IgG1, IgG3 і IgG4. Іншими кращими константними областями важкого ланцюга для одержання химерних антитіл є IgG2, IgA, IgD і IgM.

Гуманізація

Антитіла взаємодіють із цільовими антигенами переважно через амінокислотні залишки, розташовані в шести гіперваріабельних ділянках (CDR) важкого й легкого ланцюгів. Із цієї причини амінокислотні послідовності в CDR більш відрізняються між окремими антитілами, ніж послідовності поза CDR. Оскільки CDR-послідовності відповідають за більшість взаємодій антитіло-антиген, є можливою експресія рекомбінантних антитіл, які наслідують властивості специфічних природних антитіл, шляхом конструювання векторів експресії, які включають CDR-послідовності від специфічних природних антитіл, пересажені на каркасні послідовності від іншого антитіла з іншими властивостями (див., наприклад, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; і Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 86: 10029-10033). Такі каркасні послідовності можна одержати з публічних баз даних ДНК, які включають зародкові послідовності генів антитіл. Ці зародкові послідовності будуть відрізнятися від зрілих послідовностей генів антитіл, тому що вони не включають повністю зібрані мінливі гени, які формуються при V (D) J з'єднанні під час дозрівання В-клітини.

Здатність антитіла зв'язуватися з CLDN6 можна визначити за допомогою стандартних методів аналізу зв'язування (наприклад, ELISA, вестерн-блотинг, імунофлуоресценція й проточна цитометрія).

З метою очищення моноклональних антитіл відібрані гібридами вирощують у дволітровій ролерній колбі. Альтернативно антитіла можна одержати в біореакторі на основі діалізу. За необхідності супернатанти можна профільтрувати, концентрувати перед проведенням афінної хроматографії із протеїн-G-сефарозою або протеїн-A-сефарозою. Чистоту елюйованого IgG можна проконтролювати за допомогою гель-електрофорезу й високоефективної рідинної хроматографії. Буферний розчин можна поміняти на PBS, а концентрацію можна визначити при OD280 з використанням коефіцієнта екстинції 1,43. Моноклональні антитіла можна розділити на аліквоти і зберігати при -80 °C.

Для того щоб визначити, чи зв'язуються відібрані моноклональні антитіла з єдиним епітопом, може бути застосований сайт-спрямований або мульти-сайт-спрямований мутагенез.

Для встановлення ізотипа очищених антитіл проводили аналіз ELISA з різними комерційними наборами (наприклад, Zymed, Roche Diagnostics). Комірки титраційних мікропланшетів покривають антимишачим Ig. Після блокування (інгібування) проводили реакцію з моноклональними антитілами або очищеними ізотипними контролюми за кімнатної температури протягом двох годин. Потім проводили реакцію або з мишачим IgG1, IgG2a, IgG2b або IgG3, IgA або зі специфічним мишачим IgM, кон'югованим з пероксидазою. Після промивання планшети обробляють ABTS субстратом (1 мг/мл) і досліджують при OD 405-650. Альтернативно, можна використовувати набір для ізотипування Isotrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027), як описано виробником.

Для того щоб продемонструвати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати проточну цитометрію. Лінії клітин, які експресують антиген у нормі або після трансфекції, і негативні контролю, що втратили експресію антигену (вирощені за стандартних умов), змішують із різними концентраціями моноклональних антитіл у супернатантах від гібридом або в PBS, що містить 1 % FBS, і інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Після промивання мічені APC або Alexa647 анти-IgG антитіла можуть зв'язуватися з антиген-зв'язаними моноклональними антитілами за таких же умов, як умови для фарбування первинних антитіл. Зразки можна проаналізувати за допомогою проточної цитометрії на приладі FACS, використовуючи параметри прямого й бічного розсіювання світла, щоб пропускати окремі живі клітини. Для того, щоб відрізнити антиген-специфічні моноклональні антитіла від неспецифічних зв'язувальних речовин в одному вимірюванні, можна використовувати метод котрансфекції. Клітини тимчасово трансфіковані плазмідами, які кодують антиген, і флуоресцентним маркером, можна пофарбувати, як описано вище. Трансфіковані клітини можна виявити в іншому діапазоні флуоресценції, ніж антитіло-пофарбовані клітини. Оскільки більшість трансфікованих клітин експресує обидва трансгени, антиген-специфічні моноклональні антитіла зв'язуються переважно із клітинами, які експресують флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються в співрозмірному співвідношенні з нетрансфікованими клітинами. Можна застосовувати альтернативний метод аналізу з використанням флуоресцентної мікроскопії на додачу до або замість проточної цитометрії. Клітини можна пофарбувати так, як описано вище, і досліджувати за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Для того щоб продемонструвати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати імунофлуоресцентну мікроскопію. Наприклад, клітинні лінії, які експресують антиген або спонтанно або після трансфекції, і негативні контролю, які втратили експресію антигену, вирощують на предметних скельцях з комірками за стандартних умов росту в середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FCS), 2 mM L-глутаміну, 100 мкг/мл пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Потім клітини фіксують метанолом або параформальдегідом або залишають необробленими. Потім проводять реакцію клітин з моноклональними антитілами до антигену протягом 30 хвилин при 25 °C. Після промивання проводять реакцію клітин з міченими Alexa555 антимишачими IgG вторинними антитілами

(Molecular Probes) за тих же самих умов. Після цього можна досліджувати клітини за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Із клітин, які експресують антиген та відповідних негативних контролів можна приготувати клітинні екстракти, а потім провести електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS). Після електрофорезу відділені антигени переносять на нітроцелюлозні мембрани, інгібують і досліджують за допомогою тестованих моноклональних антитіл. IgG-зв'язування можна визначити за допомогою антимишачого IgG міченого пероксидазою і виявити за допомогою ECL субстрату.

Антитіла можна додатково протестувати на реакційну здатність із антигеном за допомогою імуногістохімічного аналізу добре відомим фахівцеві в даній галузі способом, наприклад, з використанням кріозрізів, фіксованих параформальдегідом або ацетоном, або фіксованих параформальдегідом парафінових зрізів зразків неракових тканин або ракових тканин, узятих у пацієнта під час звичайних хірургічних процедур, або в мишей із ксенотрансплантатом пухлин, інокульованих за допомогою ліній клітин, які експресують антиген спонтанно або після трансфекції. Для імунофарбування антитіла, які реагують із антигеном, можуть бути проінкубовані, а потім кон'юговані з міченими пероксидазою хрину козячими антимишачими або козячими антикроликовими антитілами (DAKO) згідно з інструкціями продавця.

Антитіла можна протестувати щодо їх здатності опосередковувати фагоцитоз і знищення клітин, які експресують CLDN18.2. Перевірка активності моноклональних антитіл *in vitro* забезпечує первинний скринінг до тестування на моделях *in vivo*.

Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC):

Коротко, поліморфноядерні клітини (PMN), NK-клітини, моноцити, мононуклеарні клітини або інші ефекторні клітини від здорових донорів можна очистити центрифугуванням у градієнті щільності фікол-гіпака, з наступним руйнуванням забруднюючих еритроцитів. Промиті ефекторні клітини суспендують в RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки або альтернативно з 5 % інактивованої нагріванням людської сироватки й змішують із ^{51}Cr -міченими клітинами-мішенями, які експресують CLDN18.2, у різних співвідношеннях ефекторних клітин до клітин-мішеней. Альтернативно, клітини-мішені можна позначити лігандом, який підсилює флуоресценцію (BATDA). Високофлуоресцентний хелат європію з посилюючим лігандом, який вивільняється з мертвих клітин, можна визначити за допомогою флуориметра. В іншому альтернативному способі може використовуватися трансфекція клітин-мішеней з використанням люциферази. При цьому доданий люцифер жовтий може окислюватися тільки живими клітинами. Потім можна додати очищені анти-CLDN18.2 IgGs у різних концентраціях. Як негативний контроль можна використовувати нерелевантний людський IgG. Дослідження проводиться протягом від 4 до 20 годин при 37 °C залежно від типу ефекторних клітин які використовуються. Цитоліз у зразках можна оцінити шляхом вимірювання вивільнення ^{51}Cr або наявності хелата EuTDA у культуральному супернатанті. Альтернативно, можна виміряти люмінесценцію живих клітин, що є результатом окислення люцифера жовтого.

Також можна перевірити різні комбінації анти-CLDN18.2 моноклональних антитіл, щоб визначити чи підсилюється цитоліз при дії композицій моноклональних антитіл.

Комплементзалежна цитотоксичність (CDC):

Моноклональні анти-CLDN6 антитіла можна перевірити щодо їхньої здатності опосередковувати CDC за допомогою ряду відомих методів. Наприклад, сироватку для одержання комплементу можна одержати із крові відомим фахівцям способом. Для визначення CDC-активності моноклональних антитіл можна використовувати різні методи. Наприклад, можна вимірювати вивільнення ^{51}Cr або можна оцінити підвищену проникність мембран за допомогою методу виключення пропідіум йодиду (PI). Коротко, цільові клітини промивають і 5×10^5 /мл інкубують з різними концентраціями mMAb протягом 10-30 хвилин за кімнатної температури або при 37 °C. Потім додають сироватку або плазму до остаточної концентрації 20 % (об./об.) і клітини інкубують при 37 °C протягом 20-30 хвилин. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI у пробірку для FACS-аналізу. Після цього суміш негайно аналізують за допомогою проточної цитометрії, використовуючи FACS-набір.

В альтернативному способі дослідження індукцію CDC можна встановити на прикріплених клітинах. В одному варіанті здійснення цього методу аналізу клітини висівають за 24 години до дослідження із щільністю 3×10^4 /комірку в плоскодонні титраційні мікропланшети для культур тканин. Наступного дня ростове середовище видалюють і клітини інкубують з антитілами (три повторності). Контрольні клітини інкубують у ростовому середовищі або ростовому середовищі, яке містить 0,2 % сапоніну для визначення фонового лізису й максимального лізису, відповідно. Після інкубації протягом 20 хвилин за кімнатної температури супернатант видалюють, і додають

до клітин 20 % (об./ об.) людської плазми або сироватки в DMEM (попередньо нагрітої до 37 °C) і інкубують протягом наступних 20 хвилин при 37 °C. До клітин кожного зразка додають розчин пропідій йодиду (10 мкг/мл). Потім супернатанти заміняють PBS, які містять 2,5 мкг/мл етидіум броміду, і вимірюють вихідну флуоресценцію після зрушення при 520 нм при 600 нм за допомогою Tecan Satire. Відсоток специфічного лізису обчислюють як зазначено далі: відсоток специфічного лізису = (флуоресценція зразка - фонова флуоресценція) / (флуоресценція при максимальному лізисі- фонова флуоресценція) × 100.

Індукція апоптозу й інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами

Наприклад, щоб перевірити здатність моноклональних анти-CLDN18.2 антитіл ініціювати апоптоз, їх інкубують з пухлинними клітинами, позитивними за CLDN18.2, наприклад, SNU-16, DAN-G, KATO-III або CLDN18.2-трансфікованими пухлинними клітинами при 37 °C протягом 20 годин. Клітини збирають, промивають в анексин-V зв'язувальному буфері (BD biosciences), і інкубують з анексином V, з'єднаним з FITC або APC (BD biosciences), протягом 15 хвилин у темряві. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI (10 мкг/мл в PBS) у пробірку для FACS-аналізу й відразу оцінюють за допомогою проточної цитометрії (як описано вище). Альтернативно, загальне інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами можна визначити за допомогою комерційно доступних наборів. За допомогою набору для визначення клітинної проліферації DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) можна провести неізотопний імуноаналіз у мікропланшетах, заснований на вимірюванні включення 5-бром-2'-дезоксидуридину (BrdU) під час синтезу ДНК проліферуючими клітинами. Включений BrdU визначають за допомогою мічених європієм моноклональних антитіл. Щоб зробити можливим виявлення антитіл, клітини фіксують і проводять денатурацію ДНК, використовуючи Fix (фіксуючий) розчин. Незв'язані антитіла змивають і додають у розчин індуктор DELFIA, щоб відокремити іони європію від мічених антитіл, де вони утворюють високофлуоресцентні хелати з компонентами індуктора DELFIA. Флуоресценція, яка визначається в кожній комірці за допомогою флуориметрії з часовим розрізненням, є пропорційною до синтезу ДНК у клітині.

Доклінічне дослідження

Моноклональні антитіла, які зв'язуються з CLDN18.2, також можуть бути перевірені на моделі *in vivo* (наприклад, на імунодефіцитних мишах із ксенотрансплантатами пухлин, інокульованих клітинними лініями, які експресують CLDN18.2, наприклад, DAN-G, SNU-16 або KATO-III, або після трансфекції, наприклад, HEK293) для встановлення їх ефективності при контролюванні росту пухлинних клітин, які експресують CLDN18.2.

Дослідження антитіл запропонованих винаходом *in vivo* можна провести після ксенотрансплантації пухлинних клітин, які експресують CLDN18.2, імунодефіцитним мишам або іншим тваринам. Щоб визначити дію антитіл на запобігання утворення пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлинами, антитіла можна ввести мишам, які не мають пухлин, з подальшою ін'єкцією пухлинних клітин. Щоб установити терапевтичну ефективність відповідних антитіл відносно зменшення пухлинного росту або симптомів, пов'язаних з пухлинами, антитіла можна ввести мишам-носіям пухлин. Застосування антитіл можна комбінувати із застосуванням інших речовин, таких як цитостатичні засоби, інгібітори факторів росту, блокатори клітинного циклу, інгібітори ангіогенезу або іншими антитілами, щоб визначити синергічну ефективність і потенційну токсичність комбінацій. Щоб проаналізувати токсичні побічні явища, опосередковані антитілами, тваринам можна інокульовати антитіла або контрольні реагенти й ретельно вивчити симптоми, можливо пов'язані з терапією антитілами до CLDN18.2. Зокрема, можливі побічні явища від застосування *in vivo* CLDN18.2-антитіл включають токсичний вплив на тканини, які експресують CLDN18.2, включаючи шлунок. Антитіла, які розпізнають CLDN18.2 у людини й в інших видів, наприклад, мишей, є, зокрема, придатними для передбачення можливих побічних явищ, опосередкованих застосуванням моноклональних CLDN18.2 -антитіл, у людей.

Картування епітопів, які розпізнаються антитілами, можна провести, як докладно описано в "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 і в "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

Сполуки й засоби, описані в даному документі, можуть бути введені у вигляді будь-якої придатної фармацевтичної композиції.

Фармацевтичні композиції в більшості випадків надаються в стандартній лікарській формі й можуть бути отримані добре відомим способом. Наприклад, фармацевтична композиція може мати форму розчину або суспензії.

Фармацевтична композиція може містити солі, буферні речовини, консервуючі речовини, носії, розріджувачі й/або ексципієнти, усі з яких бажано є прийнятними з погляду фармацевтики. Термін "фармацевтично прийнятний" відноситься до нетоксичної речовини, яка не втручається

в дію активного компонента фармацевтичної композиції.

Солі, які не є фармацевтично прийнятними, можуть використовуватися для одержання фармацевтично прийнятних солей і включаються у винахід. Фармацевтично прийнятні солі цього типу включають, без обмеження, солі, отримані з наступних кислот: хлористоводневої, бромистоводневої, сірчаної, азотної, фосфорної, малеїнової, оцтової, саліцилової, лимонної, мурашиної, малонної, бурштинової й подібних до них. Фармацевтично прийнятні солі також можуть бути отримані у вигляді солей лужних або лужноземельних металів, таких як солі натрію, солі калію й солі кальцію.

Придатні для використання у фармацевтичній композиції буферні речовини включають оцтову кислоту у вигляді солі, лимонну кислоту у вигляді солі, борну кислоту у вигляді солі й фосфорну кислоту у вигляді солі.

Придатні для використання у фармацевтичній композиції консервуючі речовини, включають бензалконію хлорид, хлорбутанол, парабен і тимеросал.

Призначена для ін'єкцій композиція може містити фармацевтично прийнятний ексципієнт, такий як лактат Рінгера.

Термін "носій" має відношення до органічного або неорганічного компонента, природного або синтетичного походження, з яким активний компонент поєднується, для того, щоб полегшити, підсилити або сприяти застосуванню. Згідно з винаходом термін "носій" також включає один або більше сумісних твердих або рідких наповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючих речовин, придатних для введення пацієнтові.

Прийнятними для парентерального введення речовинами-носіями є, наприклад, стерильна вода, розчин Рінгера, лактат Рінгера, стерильний розчин хлориду натрію, поліалкіленгліколі, гідрогенізовані нафталіни й, зокрема, біологічно сумісні полімери лактида, співполімери лактида із гліколідом або співполімери поліоксиетилену з поліоксипропіленом.

Термін "ексципієнт", який використовується в описі позначає всі речовини, які можуть бути присутніми у фармацевтичній композиції й не є активними інгредієнтами, такі як, наприклад, носії, зв'язуючі речовини, змашувальні речовини, загущувальні речовини, поверхнево-активні речовини, консервуючі речовини, емульгуючі речовини, буферні речовини, ароматизуючі речовини або барвники.

Засоби й композиції, описані в даному документі, можуть вводитися будь-яким звичайним способом, наприклад, парентеральним шляхом, включаючи ін'єкцію або інфузію. Краще введення здійснюється парентерально, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, підшкірно, внутрішньошкірно або внутрішньом'язево.

Композиції, придатні для парентерального введення, звичайно включають стерильні водні або неводні препарати активної сполуки, бажано ізотонічні відносно крові реципієнта. Прикладами сумісних носіїв і розчинників є розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, стерильні, жирні олії використовуються як середовище для розчину або суспензії.

Засоби й композиції, описані в даному документі, вводяться в ефективних кількостях. "Ефективна кількість" відноситься до кількості, за допомогою якої досягають бажаної реакції або бажаного ефекту окремо або в комбінації з додатковими дозуваннями. У випадку лікування конкретної хвороби або конкретного стану бажаною реакцією бажано є інгібування розвитку хвороби. Сюди включається уповільнення розвитку хвороби й, зокрема, переривання або зворотній розвиток хвороби. Бажаною реакцією при лікуванні хвороби або стану також може бути затримка початку або запобігання початку зазначеної хвороби або зазначеного стану.

Ефективна кількість засобу або композиції, описаної в даному документі, буде залежати від стану, який необхідно лікувати, тяжкості захворювання, індивідуальних характеристик пацієнта, включаючи вік, фізіологічний стан, розмір і вага, тривалість лікування, тип супутнього лікування (якщо воно є), конкретний спосіб введення й подібні фактори. Відповідно дозування, яке вводиться, описаних тут засобів може залежати від тих або інших подібних характеристик. У тому випадку, коли реакція пацієнта є недостатньою при використанні первинного дозування, можуть використовуватися більш високі дози (або ефективні більш високі дози досягаються за допомогою іншого більш локального способу введення).

Засоби й композиції, описані в цьому документі, можуть вводитися пацієнтам, наприклад, *in vivo*, для лікування або запобігання цілому ряду захворювань, таких, як описані тут. Бажано пацієнтами є люди, які мають захворювання, які можуть бути вилікувані або поліпшені введенням засобів і композицій, описаних тут. Сюди включаються захворювання, в яких задіяні клітини, які характеризуються зміненим профілем CLDN18.2.

Наприклад, в одному варіанті здійснення описані тут антитіла можуть використовуватися для лікування пацієнта з раковою хворобою, наприклад, раковою хворобою, яку описано тут, яка відрізняється наявністю ракових клітин, які експресують CLDN18.2.

Фармацевтичні композиції й способи лікування, описані відповідно до винаходу, також можуть використовуватися для імунізації або вакцинації з метою запобігання описаної тут хвороби.

Даний винахід додатково ілюструється наступними прикладами, які не слід розглядати як такі, що обмежують рамки винаходу.

Приклади

Приклад 1: Експресія CLDN18.2 у лінії клітин раку шлунка людини стабілізується при обробці хіміотерапевтичними препаратами *in vitro*

Клітини KatolIII, лінія клітин раку шлунка людини, культивували в середовищі RPMI 1640 (Invitrogen), яке містить 20 % FCS (Perbio) і 2 mM Glutamax (Invitrogen) при 37 °C і 5 % CO₂ з або без цитостатичних сполук. Епірубіцин (Pfizer) був перевірений у концентрації 10 або 100 нг/мл, 5-FU (Neofluor від компанії Neocorp AG) був перевірений у концентрації 10 або 100 нг/мл, і оксаліплатин (Hospira) був перевірено при концентрації 50 або 500 нг/мл. Також використовували комбінацію всіх 3 сполук (EOF; епірубіцин 10 нг/мл, оксаліплатин 500 нг/мл, 5-FU 10 нг/мл). 8 × 10⁵ клітин KatolIII культивували протягом 96 годин, не міняючи середовище, або протягом 72 годин з наступним культивуванням протягом 24 годин у стандартному середовищі, щоб "зняти" із блокування клітинного циклу клітин, в 6-коміркових культуральних планшетах при 37 °C, 5 % CO₂. Клітини збирали, використовуючи EDTA/трипсин, промивали й досліджували.

Для виявлення позаклітинного CLDN18.2 клітини фарбували моноклональними анти-CLDN18.2 антитілами IMAB362 (Ganymed) або спорідненими за ізотипом контрольними антитілами (Ganymed). Як вторинний реагент використовували анти-hulgG-APC від компанії Dianova.

Визначення стадій клітинного циклу ґрунтувалося на вимірюванні вмісту ДНК у клітинах. Це давало можливість розрізняти клітини, які перебувають у фазах G1, S або G2 клітинного циклу. В S-Фазі відбувається подвоєння ДНК, тоді як в G 2-фазі клітини ростуть і готуються до мітозу. Аналіз клітинного циклу був зроблений з використанням набору Cycletest PLUS DNA Reagent від компанії BD Biosciences відповідно до протоколу виробника. Проточну цитометрію та її аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення BD FACS Cantoll (BD Biosciences) і FlowJo (Tree Star).

Стовпчики на Фігурі 1a і b показують відповідний відсоток клітин в G1-, S- або G2-фазі клітинного циклу. Клітини KatolIII, культивовані в середовищі, демонструють зупинку клітинного циклу переважно в G1-фазі. Клітини, оброблені 5-FU, переважно блокуються в S-Фазі. Клітини KatolIII, оброблені епірубіцином або EOF, демонструють зупинку клітинного циклу переважно в G 2-фазі. При обробці клітин оксаліплатином спостерігається накопичення клітин переважно в G1- і G 2-фазах. Як видно на Фігурі 1c, зупинка клітинного циклу в S-Фазі або G 2-фазі призводить до стабілізації або підвищення експресії CLDN18.2. Відразу після того, як клітини виходять із будь-якої фази клітинного циклу (Фігура 1b), експресія CLDN18.2 на клітинній поверхні клітин KatolIII підвищується (Фігура 1d).

Клітини NUGC-4 і KATO III обробляли 5-FU+OX (10 нг/мл 5-FU і 500 нг/мл оксаліплатину), EOF (10 нг/мл епірубіцину, 500 нг/мл оксаліплатину й 10 нг/мл 5-FU) або FLO (10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолінової кислоти й 500 нг/мл оксаліплатину) протягом 96 годин. РНК попередньо оброблених хіміотерапевтичними препаратами NUGC-4 і KATO III клітин була виділена й перетворена на кДНК. Рівень CLDN18.2 транскрипта аналізували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі. Результати показані на Фігурі 2a у вигляді відносної експресії в порівнянні з рівнем транскрипта конститутивного гена HPRT. На Фігурі 2b показаний вестерн-блотинг CLDN18.2 і "навантажених" актином контрольних необроблених і оброблених клітин NUGC-4. Інтенсивність сигналу люмінесценції показана у відсотках відносно актину.

Попередня обробка NUGC-4 і KATO III клітин EOF, FLO, а також комбінацією 5-FU+OX хіміотерапевтичних препаратів приводила до збільшення рівнів РНК і білка CLDN18.2, що показано за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (Фігура 2a) і вестерн-блотинга (Фігура 2b).

Зв'язування IMAB362 на NUGC-4 і KATO III клітинах раку шлунка, оброблених EOF (10 нг/мл епірубіцину, 500 нг/мл оксаліплатину й 10 нг/мл 5-FU) або FLO (10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолінової кислоти й 500 нг/мл оксаліплатину) протягом 96 годин аналізували за допомогою проточної цитометрії. Спостерігалось підвищення кількості білка CLDN18.2, на який націлюється IMAB362 на поверхні клітин раку шлунка, як видно на Фігурі 2c. Цей ефект найбільш виражений на клітинах, попередньо оброблених EOF або FLO.

Клітини KatolIII попередньо обробляли протягом 4 днів іринотеканом або доцетакселем і аналізували експресію CLDN18.2 і зупинку клітинного циклу. Обробка клітин іринотеканом

приводила до залежного від дози інгібування клітинного росту й зупинки клітинного циклу в S/G 2-фазі (Фігура 3). Обробка клітин доцетакселем приводила до дозозалежного інгібування клітинного росту й зупинки клітинного циклу в G 2-фазі (Фігура 3).

Приклад 2: Попередня обробка клітин раку шлунка людини хіміотерапевтичними препаратами дає в результаті більш високу ефективність IMAB 362-опосередкованого ADCC

IMAB 362-опосередкований ADCC вивчали, використовуючи як мішеней клітини раку шлунка NUGC-4, які попередньо обробляли 10 нг/мл 5-FU і 500 нг/мл оксаліплатину (5-FU+OX), 10 нг/мл епірубіцину, 500 нг/мл оксаліплатину й 10 нг/мл 5-FU (EOF) або 10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолінової кислоти й 500 нг/мл оксаліплатину (FLO) протягом 96 годин (співвідношення ефектор: мішень 40:1) або нічим не обробляли. Значення EC_{50} були отримані від 7 здорових донорів для необроблених і попередньо оброблених EOF, FLO або 5-FU+OX клітин NUGC-4.

Як показано на Фігурі 4а, крива залежності доза-ефект у порівнянні з попередньо обробленими клітинами зміщена вгору й увліво в порівнянні з необробленими клітинками-мішенями. У результаті цього спостерігався більш високий максимальний лізис і зменшення значень EC_{50} до однієї третини значення необроблених клітин (Фігура 4b).

Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMCs), включаючи NK-клітини, моноцити, мононуклеарні клітини або інші ефекторні клітини від здорових людей-донорів виділяли центрифугуванням у градієнті щільності фікол-гіпаку. Промиті ефекторні клітини висівали в X-Vivo середовище. За такої постановки завдання як клітини-мішені використовувались KatolIII клітини гастрального походження, які ендогенно експресують CLDN18.2. Тільки живі клітини окислюють люцифер жовтий за допомогою ферменту люциферази, який стабільно експресується клітинками-мішенями. Очищене анти-CLDN18.2 антитіло IMAB362 додавали в різних концентраціях, а як ізотипове контрольне антитіло використовували нерелевантне химерне hulgG1 антитіло. Цитоліз у зразках оцінювали шляхом вимірювання люмінесценції, яка є результатом окислення люцифера жовтого, що є показником кількості живих клітин, які залишилися після IMAB 362-індукованої цитотоксичності. KatolIII клітини, попередньо оброблені протягом 3 днів іринотеканом (1000 нг/мл), доцетакселем (5 нг/мл) або цисплатином (2000 нг/мл), порівнювали із клітинами-мішенями, культивованими в середовищі без обробки препаратами, і оцінювали IMAB 362-індукований ADCC.

При попередній обробці протягом 3 днів іринотеканом, доцетакселем або цисплатином клітин KatolIII спостерігався більш низький рівень живих клітин у порівнянні із клітинами-мішенями, культивованими в середовищі (Фігура 5а), при цьому експресія клаудину18.2 у клітинах, попередньо оброблених іринотеканом, доцетакселем або цисплатином, була підвищена в порівнянні із клітинами, культивованими в середовищі (Фігура 5b).

Крім того, попередня обробка клітин KatolIII іринотеканом, доцетакселем або цисплатином збільшувала потенційну можливість IMAB362 викликати ADCC (Фігура 5с, d).

Приклад 3: Хіміотерапія приводить до більш високої ефективності IMAB 362-індукованого CDC

Вплив хіміотерапевтичних засобів на IMAB 362-індукований CDC досліджували за допомогою попередньої обробки клітин раку шлунка KatolIII комбінацією 5-FU 10 нг/мл і оксаліплатину 500 нг/мл (5-FU+OX) протягом 48 годин. Типові криві доза-ефект IMAB 362-індукованого CDC з використанням попередньо оброблених хіміотерапевтичними препаратами клітин KatolIII показані на Фігурі 6. Попередня обробка пухлинних клітин протягом 48 годин збільшувала потенційну можливість IMAB362 викликати CDC, що призводило до більш високого максимального лізису попередньо оброблених пухлинних клітин у порівнянні з необробленими клітинами.

Приклад 4: Здатність імунних ефекторних клітин здійснювати IMAB 362-опосередкований ADCC не порушується обробкою хіміотерапевтичними препаратами

Хіміотерапевтичні засоби, які були використані в режимах EOF або FLO, є сильнодіючими при інгібуванні проліферації клітин-мішеней. Для вивчення негативної дії хіміотерапії на ефекторні клітини, PBMC від здорових донорів обробляли 10 нг/мл епірубіцину, 500 нг/мл оксаліплатину й 10 нг/мл 5-FU (EOF) або 10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолінової кислоти й 500 нг/мл оксаліплатину (FLO) протягом 72 годин до проведення ADCC-аналізів. Фігура 7а показує значення EC_{50} 4^x здорових донорів, а Фігура 7b показує характерні криві залежності доза-ефект IMAB 362-індукованого ADCC з використанням ефекторних клітин, попередньо оброблених EOF або FLO. IMAB 362-індукований ADCC клітин раку шлунка NUGC-4 не порушується у зв'язку з хіміотерапією EOF або FLO.

Приклад 5: Комбінація обробки ZA/IL-2 призводить до оптимізованого збільшення культивованих мононуклеарних клітин периферійної крові (PBMC)

Дія ZA/IL-2 на проліферацію культивованих PBMC була оцінена in vitro. PBMC одержували

від здорових людей-донорів, і культури обробляли одноразовою дозою ZA. IL-2 додавали кожні 3-4 дні. Конкретно, отримані від 3 різних здорових донорів PBMC (#1, #2, #3) культивували в середовищі RPMI (1×10^6 клітин/мл) протягом 14 днів з 1 мкМ ZA плюс висока (300 У/мл) або низька (25 У/мл) доза IL-2; див. Фігуру 8a. PBMC тих самих донорів культивували додатково в середовищі RPMI протягом 14 днів з 300 У/мл IL-2 плюс ZA або без ZA; див. Фігуру 8b. Збільшення кількості клітин визначали, підраховуючи живі клітини в дні 6, 8, 11 і 14.

У середовищі з додаванням високої дози IL-2 кількість клітин збільшувалася приблизно в 2 – 5 разів у порівнянні з культурами з додаванням низької дози IL-2 (Фігура 8a). Ріст клітин у середовищі без ZA був приблизно в 2 рази нижчим в порівнянні із клітинами, які ростуть у середовищі з ZA (Фігура 8b). Ці результати показують необхідність використання двох сполук ZA і IL-2 у комбінації для забезпечення належного розмноження клітин.

Приклад 6: Обробка ZA/IL-2 приводить до підвищеного росту V γ 9V δ 2 Т-клітин в PBMC-культурах

PBMC культивували протягом 14 днів у середовищі RPMI з додаванням 300 У/мл IL-2 і з або без 1 мкМ ZA. Відсоток V γ 9+V δ 2+ Т-клітин у межах популяції лімфоцитів CD3+ (Фігура 9a) і відсоток CD16+ клітин у межах CD3+V γ 9+V δ 2+ Т-клітинної популяції (Фігура 9b) визначали за допомогою багатобарвного FACS-аналізу в дні 0 і 14. Результати для кожного донора оцінювали в діаграмі розсіювання. На Фігурі 9c представлена діаграма розсіювання, що показує збільшення протягом часу (збагачення) кількості CD3+V γ 9+V δ 2+ і CD3+CD16+V γ 9+V δ 2+ Т-клітин у межах популяції лімфоцитів. Ураховували кількість клітин, висіяних у день 0, і кількість клітин, зібраних в 14 день.

Додавання IL-2 в PBMC-культури необхідно для виживання й росту лімфоцитів. Вони ефективно ростуть у культурах з додаванням 300 У/мл IL-2. FACS-аналіз із використанням V γ 9 і V δ 2 специфічних антитіл показав, що додавання ZA/IL-2 специфічно викликає накопичення V γ 9V δ 2 Т-клітин (Фігура 9a). Через 14 днів CD3+ популяція лімфоцитів може містити до 80 % V γ 9V δ 2 Т-клітин. Частина V γ 9V δ 2 Т-клітин експресує CD16, тоді як збагачення цих клітин у межах CD3+ популяції лімфоцитів є 700-разовим залежно від донора (Фігури 9b і 9c). Збагачення CD16+V γ 9+V δ 2+Т клітин у культурах в 10-600 разів вище в порівнянні з культурами, які ростуть без ZA (Фігура 9c). Ми зробили висновок, що обробка ZA/IL-2 PBMCs *in vitro* приводить до посилення експресії ADCC-опосередкованого Fc γ III рецептора CD16 у значній частині V γ 9V δ 2 Т-клітин.

Приклад 7: IL-2 впливає на ріст V γ 9V δ 2 Т-клітин дозозалежним чином

Додавання ZA у культури є найбільш важливим фактором стимулювання розвитку V γ 9V δ 2 Т-клітин. Добре відомо, що для росту й виживання Т-клітин потрібно IL-2.

PBMC культивували протягом 14 днів у середовищі RPMI з додаванням 1 мкМ ZA і зростаючих концентрацій IL-2. IL-2 додавали в дні 0 і 4. Збагачення CD16+V γ 9+V δ 2+ Т-клітин у межах популяції лімфоцитів CD3+ визначали за допомогою багатобарвного FACS аналізу в дні 0 і 14. Для порівняння різних донорів визначили кількість CD16+V γ 9+V δ 2+ Т-клітин, зібраних після культивування з 600 У/мл IL-2, було взято за 100 %; див. Фігуру 10, ліворуч. Крім того, була перевірена ADCC-активність ізольованих культур, вирощених за 14 днів у зростаючих концентраціях IL-2; див. Фігуру 10, праворуч.

Проведення дозозалежного аналізу підтвердило, що IL-2 також стимулюють ріст і виживання підгрупи V γ 9V δ 2 Т-клітин. При додаванні низьких концентрацій IL-2 у середовище була виявлена кореляція між дозою IL-2 і відсотком CD16+V γ 9V δ 2 Т-клітин у межах популяції лімфоцитів CD3+ (Фігура 10, ліворуч). ADCC-активність клітин, вирощених за більш високих концентрацій IL-2 (150-600 У/мл), краще в порівнянні із клітинами, вирощеними за низьких концентрацій IL-2 (Фігура 10, праворуч).

Приклад 8: ZA викликає вироблення IPP у моноцитах і ракових клітинах, стимулюючи збільшення V γ 9V δ 2 Т-клітин

Свіжі PBMCs (Ехр. #1) або 14-денні, стимульовані ZA/IL-2 культури V γ 9V δ 2 Т-клітин (Ехр. #2-5), інкубували або без моноцитів (співвідношення ефектор: моноцит 1:0), з 0,2-разовою (4:1) або 5-разовою (співвідношення 1:4) кількістю моноцитів + 1 мкМ ZA. Збільшення V γ 9V δ 2 Т-клітин у спільних культурах через 14 днів визначали за допомогою багатобарвного FACS-аналізу, при цьому збільшення культури враховували при підрахунку. Коефіцієнт збагачення V γ 9V δ 2 Т-клітин, культивованих з моноцитами в співвідношенні 1:4, був узятий за 100 % для кожного експерименту. Збільшення моноцитів у культурі приводило до збагачення V γ 9V δ 2 Т-клітин більше ніж в 10 разів. Цей ефект був явно ZA-залежним; див. Фігуру 11a.

Крім того, клітини раку шлунка людини (NUGC-4-люцифераза) і мишачі клітини раку шлунка (пофарбовані кальцеїном CLS103) були попередньо оброблені з або без 5 мкМ ZA протягом 2 днів. Людські V γ 9V δ 2 Т-клітини, виділені за допомогою MACS (день 14), спільно культивували з

раковими клітинами протягом 24 годин. Цитотоксичність V γ 9V δ 2 T-клітин у порівнянні з необробленими і ZA-обробленими клітинами-мішенями визначали шляхом вимірювання активності решти люциферази або флуоресценції кальцеїну; див. Фігуру 11b. Клітини-мішені (NUGC-4 і CLS103) попередньо обробляли з або без 5 мкМ ZA протягом 2 днів і потім інкубували протягом 4 годин з мітоміцином C (50 МІ) для зупинки проліферації. MACS-очищені людські 14-денні V γ 9V δ 2 T-клітини, які перебувають у спокої й ³H-тимідин додали до клітин-мішеней і об'єднані культури інкубували протягом 48 годин при 37 °С. Проліферацію визначали, вимірюючи включення ³H тимідину в ДНК за допомогою сцинтиляційного лічильника MicroBeta. Проліферація клітин-мішеней, не оброблених ZA і без V γ 9V δ 2 T-клітин, була прийнята за 100 %; див. Фігуру 11с.

Як видно на Фігурах 11b і 11с, ZA-активовані клітини раку людини активували V γ 9V δ 2 T-клітини, маючи на увазі цитотоксичність (5-10 разів) і проліферацію (1,4-1,8 разів), тоді як лінія ракових клітин миші CLS103 не мала такого впливу на V γ 9V δ 2 T- клітини.

Приклад 9: Обробка ZA/IL-2 впливає на склад культур PBMC

Ріст і диференціювання специфічних типів клітин в PBMC культурах залежить від присутності цитокінів. Ці компоненти або додають до середовища (наприклад, фактори росту, які присутні в сироватці, IL-2) або їх секретують самі імунні клітини. Який тип клітин розвивається, також залежить від вихідного складу PBMCs і генетичної бази. Щоб проаналізувати загальне збільшення ефекторних клітин (NK клітини й V γ 9V δ 2 T-клітини), PBMC 10 різних донорів вирощували в присутності 300 У/мл IL-2 разом з або без 1 мкМ ZA протягом 14 днів. Кількість ефекторних клітин у популяції лімфоцитів була встановлена за допомогою багатобарвного FACS фарбування з використанням CD3, CD16, CD56, V γ 9 і V δ 2 антитіл. CD3-CD56+CD16+ клітини представляють NK-клітини, і CD3+V γ 9+V δ 2+ представляють V γ 9V δ 2 T-клітини.

Багатобарвний FACS-аналіз показав, що після обробки IL-2 розвиваються в основному NK-клітини, тоді як у культурах, оброблених ZA/IL-2, переважно збільшується кількість V γ 9V δ 2 T-клітин (Фігура 12).

Приклад 10: ZA/IL-2 обробка породжує V γ 9V δ 2+ ефекторні клітини пам'яті

Субпопуляції Т лімфоцитів можуть бути розмежовані за допомогою двох поверхневих маркерів, ізоформи з високою молекулярною вагою антигену лімфоцитів CD45RA і рецептора хемокінів CCR7. CCR7+ наївні й Т-клітини центральної пам'яті (СМ) відрізняються здатністю багаторазово циркулювати в лімфатичні вузли й натрапляти на антиген. На противагу до цього, ефекторні клітини пам'яті (ЕМ) і ефекторні Т-лімфоцити RA+ (TEMRA) пригнічують CCR7 і, очевидно, спеціалізуються в міграції до периферійних нелімфоїдних тканин, наприклад, в інфіковані ділянки або пухлинні ділянки. Клітини ЕМ можна додатково розділити, виходячи з характерної CD27 і CD28 експресії. Прогресуюча втрата CD28 і CD27 поверхневої експресії супроводжується активізацією цитолітичної здатності клітин. Крім того, рівень CD57 корелює з експресією гранзимів і перфоринів і в такий спосіб є третій маркер, який показує цитотоксичність/дозрівання клітини.

PBMC культивували з або без 1 мкМ ZA і 300 У/мл IL-2 протягом 14 днів. Експресію різних поверхневих маркерів визначали за допомогою багатобарвного FACS-аналізу на день 0 (PBMCs) і день 14. Наївні клітини є CD45RA+CCR7+, клітини центральної пам'яті (СМ) є CD45RA-CCR7+, TEMRA є CD45RA+CCR7- і ефекторні клітини пам'яті (ЕМ) є негативними у відношенні обох маркерів; див. Фігуру 13а. Крім того, цитолітична активність V γ 9V δ 2 T-клітин була визначена фарбуванням у відношенні CD27 і CD57 маркерів; див. Фігуру 13b, с. На додачу до цього, розвиток NK-подібних властивостей, важливих для ADCC-активності, було проаналізовано фарбуванням CD3+ клітин CD16 (зв'язування антитіла) і CD56 (адгезія); див. Фігуру 13d.

Багатобарвний FACS-аналіз V γ 9V δ 2 T-клітин показав, що ZA/IL-2 обробка явно стимулює розвиток V γ 9V δ 2 T-клітин ЕМ типу, які є CD27- і CD57+ (Фігура 13b-с). На додачу до збільшеної цитолітичної активності в популяції CD3+ спостерігалось збільшення рівня CD16 і CD56, які, як відомо, походять від NK-клітин (CD3-CD16+CD56+) і задіяні в ADCC, (Фігура 13d).

Узяті разом, ці дані означають, що ZA-обробка PBMCs приводить до розвитку CD16+V γ 9+V δ 2+ ефекторних клітин пам'яті, які здатні мігрувати до периферійних нелімфоїдних тканин і які демонструють маркери високої цитолітичної активності. У комбінації з IMAV362, націленими на пухлину антитілами, ці клітини є дуже добре пристосованими для того, щоб мігрувати, націлюватися й знищувати пухлинні клітини.

Приклад 11: вирощені в присутності ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 T-клітини є сильними ефекторами для IMAV 362-опосередкованого CLDN18.2-залежного ADCC

Подібно до NK-клітин, вирощені в присутності ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 T-клітини є позитивними у

відношенні CD16 (дивися Фігури 9 і 13), рецептор FcγrIII, через який антитіло, пов'язане із клітиною, запускає ADCC. Щоб оцінити, чи здатні Vγ9Vδ2 Т-клітини викликати сильний ADCC у комбінації з IMAB362 була проведена серія експериментів.

PBMC, отримані від 2 різних донорів (#1 і #2), культивували в середовищі з 300 U/мл IL-2 і з або без 1 мкМ ZA. Через 14 днів клітини збирали й додавали зростаючі концентрації (0,26 нг/мл - 200 мкг/мл) IMAB362 до NUGC-4 клітин, які експресують CLDN18.2. Специфічне знищення визначали за допомогою люциферазного аналізу; див. Фігуру 14a. Фігура 14b, с дає загальне уявлення про ADCC-аналізи, проведені з використанням клітин від 27 донорів, що виростили в 300 U/мл IL-2 і з або без ZA. NUGC-4 служили клітинками-мішенями. Для кожного донора значення EC₅₀ (b) обчислювали з дозозалежних кривих, і рівні максимального специфічного знищення в дозі від 200 мкг/мл IMAB362 (c) відзначали в діаграмах розсіювання.

Сильна IMAB 362-залежна ADCC активність спостерігалася у відношенні CLDN18.2-позитивних NUGC-4 клітин при використанні PBMC, культивованих протягом 14 днів з ZA/IL-2 (Фігура 14a). При використанні ZA/IL-2-оброблених PBMC культур ADCC залежить від присутності Vγ9Vδ2 Т-клітин (Фігури 12 і 15). Якщо клітини культивували без ZA, ADCC активність знижувалася в культурах від більшості донорів. У цих культурах залишкова ADCC-активність є залежною від NK-клітин (Фігури 11 і 14). При тестуванні більше 20 донорів ADCC-аналіз показав, що ZA/IL-2 обробка PBMCs поліпшує EC₅₀ і рівень максимального специфічного знищення в порівнянні з PBMC, культованими тільки з IL-2.

Крім того, PBMC двох різних донорів (#1 + #2) культивували з 1 мкМ ZA і 300 U/мл IL-2. Ці культури ефекторних клітин використовували в ADCC-аналізах з використанням CLDN18.2-позитивних (NUGC-4, Kato III) і негативних (SK-BR-3) ліній клітин-мішеней людини (Е:Т співвідношення 40:1). Були додані зростаючі кількості (0,26 нг/мл - 200 мкг/мл) IMAB362 антитіл. ADCC вимірювали, використовуючи люциферазний метод; див. Фігуру 15a. Такий же експеримент, як описаний в (a), був проведений з NUGC-4 клітинами-мішенями й ефекторними клітинами, зібраними з культур, оброблених ZA/IL-2 у різні моменти часу; див. Фігуру 15b. Такий же експеримент, як описано в (a), був проведений з використанням NUGC-4 як клітин-мішеней; див. Фігуру 15c. Вирощені в присутності ZA/IL-2 клітини або використовували безпосередньо, або Vγ9Vδ2 Т-клітини були виділені з культур з використанням TCRγδ MACS сортування (Miltenyi Biotec). Ступінь чистоти Vγ9Vδ2 Т-клітин у лімфоцитах становила більш ніж 97,0 %.

Спостерігалася сильна ADCC активність у відношенні CLDN18.2-позитивних ліній пухлинних клітин людини, але не спостерігалася у відношенні CLDN18.2-негативних ліній пухлинних клітин (Фігура 15a). Крім того, не була виявлена ADCC-активність при використанні ізотипових контрольних антитіл (не показано). У процесі ZA/IL-2 обробки ADCC літична активність збільшується протягом часу для фракції донорів (Фігура 15b). Крива доза-ефект IMAB362 зміщується вгору й уліво, показуючи кращі значення EC₅₀ і рівні максимального лізису із часом. У порівнянні з необробленими PBMC, Vγ9Vδ2 ефекторні Т-клітини, збагачені за допомогою ZA/IL-2-обробки, здатні досягати більш високого рівня знищення CLDN18.2-позитивних клітин-мішеней, крім того вони вимагають більш низьких концентрацій IMAB362 для того ж самого рівня знищення.

Щоб підтвердити, що Vγ9Vδ2 Т-клітини є джерелом літичної активності, ці клітини ізолювали зі ступенем чистоти > 97 % за допомогою магнітного сортування клітин з популяцій PBMC, культивованих з ZA/IL-2, на 14 день. ADCC-активність у комбінації з IMAB362 зберігається й почасти поліпшується внаслідок більш високої чистоти. Ці результати підтверджують, що Vγ9Vδ2 Т-клітини несуть основну відповідальність за ADCC-активність, досліджену при використанні 14-денних PBMC культур (Фігура 15c).

Приклад 12: ZA/ IL-2-обробка ліній клітин-мішеней не впливає на поверхневу експресію CLDN18.2

Ініційовані IMAB362 механізми дії строго залежать від присутності й кількості позаклітинного знайденого CLDN18.2. Тому вплив обробки ZA/IL-2 на щільність CLDN18.2 на поверхні було проаналізовано за допомогою проточної цитометрії з використанням клітинних ліній NUGC-4 і Kato III з ендогенною експресією CLDN18.2. Зокрема, був проведений проточний цитометричний аналіз зв'язування IMAB362 на непроникливі клітини NUGC-4 раку шлунка, попередньо оброблених ZA/IL-2 або ZA/IL-2+EOF або ZA/IL-2+5-FU/OX протягом 72 годин.

ZA/IL-2 обробка in vitro не викликає зміни кількості поверхово локалізованого CLDN18.2; див. Фігуру 16.

Приклад 13: Збільшення ADCC, опосередкованого IMAB362, за допомогою ZA/ IL-2-обробки PBMC не порушується попередньою обробкою EOF

Хіміотерапевтичні засоби порушують проліферацію клітин. На противагу до цього ZA/IL 2-обробка ініціює збільшення кількості Vγ9Vδ2 Т-клітин. Щоб проаналізувати вплив цих

протилежних чинників на ефекторні клітини, PBMC від 6 здорових донорів культивували з ZA/IL-2 або ZA/IL-2+EOF протягом 8 днів до використання в ADCC-аналізах (Е:Т співвідношення 15:1). Були визначені IMAB362 концентрації, що приводять до 50 % ADCC-опосередкованого лізису необроблених NUGC-4 клітин-мішеней (EC_{50}).

5 Значної зміни (приросту) ADCC, викликаного IMAB362, NUGC-4-клітин внаслідок обробки PBMC ZA/IL-2 не спостерігається при комбінованій обробці з EOF (Фігура 17).

Приклад 14: In vivo націлювання IMAB362 на CLDN18.2-позитивні пухлини й протипухлинні ефекти IMAB362 на ксенотрансплантатах пухлинних клітин на "голих" мишах

10 Для дослідження in vivo IMAB 362-націлювання на пухлинні клітини 80 мкг Dyelight® 680-міченого антитіла вводили внутрішньовенно "голим" мишам з підшкірними ксенотрансплантатами клітин раку шлунка людини NUGC-4. NUGC-4 клітини демонструють поверхневу експресію CLDN18.2, а також HER2/неу (мішень трастузумаба), але є негативними у відношенні CD20. У контрольних дослідженнях груп мишей з NUGC-4-ксенотрансплантатами вводили або Dyelight 680-мічений трастузумаб (група позитивний контроль) або Dyelight® 680-мічений ритуксимаб (негативний контроль). IMAB362 накопичується виражено й винятково в ксенотрансплантатах пухлин, що показано візуалізацією на живих мишах з використанням флуоресцентної системи візуалізації Xenogen® через 24 години після внутрішньовенної ін'єкції антитіла (Фігура 18). IMAB362 ефективно утримується в мішень-позитивній пухлині й виявляється з співрозмірною інтенсивністю навіть через 120 годин (Фігура 18). Трастузумаб також виявляється винятково в ксенотрансплантатах через 24 години після ін'єкції. Сигнал трастузумаба швидко "розмивається" у межах 120 годин після ін'єкції. При використанні ритуксимаба сигнал не виявляється.

20 Крім того, IMAB362 використовували для лікування мишей із ксенотрансплантатами CLDN18.2-позитивних пухлин. Було проведено дослідження, пов'язане з раннім лікуванням моделі пухлини (з початком уведення IMAB362 через 3 дні після інокулювання пухлинних клітин). Більше того, експерименти, пов'язані з лікуванням розвинених пухлин, починали через 9 днів після інокулювання пухлинних клітин, коли пухлини досягали об'єму близько 60-120 мм³.

"Голим" мишам підшкірно інокулювали 1×10^7 HEK293~CLDN18.2 трансфектантів. Через 3 дні після інокулювання пухлини починали лікування мишей (10 на групу). Мишам вводили 200 мкг IMAB362, інфліксимаб (як ізотиповий контроль) і PBS два рази на тиждень протягом 6 тижнів, чергуючи внутрішньовенний і внутрішньоочеревинний спосіб уведення. У той час як усі миші в групах, які одержували або PBS або ізотиповий контроль, гинули в межах 70-80 днів, тварини, яких лікували IMAB362, мали перевагу за тривалістю життя (Фігура 19). Спостерігалось не тільки збільшення часу до загибелі, а крім того 4 з 10 мишей залишалися живими протягом усього періоду спостереження 210 днів.

35 Лікування 9-10 мишей на групу починали, коли середні об'єми пухлини досягали 88 мм³ (62-126 мм³). До лікування миші були розділені на дослідні групи з метою забезпечення співрозмірності розмірів пухлин у всіх групах. Мишей лікували 200 мкг IMAB362, ізотиповим контролем або PBS два рази на тиждень протягом 6 тижнів, чергуючи внутрішньовенне й внутрішньоочеревинне введення. Усі миші в групах, яких обробили або PBS або ізотиповим контролем, загинули в межах 50-100 днів. Тварини, яких лікували IMAB362 мали перевагу у виживанні, при цьому середній час виживання майже подвоювався (47 проти 25 днів). Троє із цих мишей залишалися живими протягом повного періоду спостереження (Фігура 20). Важливо відзначити, що протипухлинна ефективність in vivo залежить від присутності мішені на пухлинних клітинах. Протипухлинні ефекти IMAB 362-обробки не були відзначені на мишах із ксенотрансплантатами CLDN18.2-негативних HEK293 пухлинних клітин.

Для вивчення ефективності IMAB362 відносно ракових клітин з ендегенною експресією CLDN18.2 використовували NUGC-4-модель раку шлунка. Спостерігався агресивний ріст клітин NUGC-4 в "голих" мишей.

50 1×10^7 клітин NUGC-4 раку шлунка вводили підшкірно в лівий бік безтимусних "голих" мишей (n=9 для IMAB362 групи; n=8 для контрольних груп). IMAB362 (200 мкг на ін'єкцію) і контролі вводили два рази на тиждень, чергуючи i.v. і i.p., починаючи через 6 днів після інокулювання пухлини за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Розміри пухлини визначали два рази на тиждень. Представлені на Фігурі 21a результати показані разом з SEM. Ріст пухлин у мишей, яких лікували IMAB362, був суттєво інгібований у порівнянні з контрольними групами мишей (*p<0,05). Фігура 21b показує об'єми пухлин на 21 день після інокуляції пухлини. Об'єми пухлин у мишей, яких лікували IMAB362, були значно меншими, ніж об'єми пухлин у контрольних мишей (* p<0,05).

60 При інокульовані мишам 1×10^7 пухлинних клітин середня тривалість життя нелікованих мишей не становила більше 25 днів. Лікування IMAB362, цетуксимабом, трастузумабом або

ізотиповим контролем і буферним контролем починали, коли об'єми пухлини досягали середнього розміру близько 109 мм³ (63 – 135 мм³). Мишей розділили на лікувальні групи з різними дозами (Фігура 21). Було показано, що IMAB362 значно зменшує швидкість росту пухлини. Значного зменшення росту пухлини в порівнянні з контролями (фізрозчин або антитіло) не спостерігалось у відношенні цієї агресивно зростаючої моделі пухлини. Уповільнення росту пухлини було пов'язане з незначним збільшенням середнього часу виживання в IMAB 362-яких лікували мишей (31 день проти 25 днів).

Протипухлинну активність IMAB362 досліджували на двох моделях ксенотрансплантатів раку шлунка людини з використанням NCI-N87 або NUGC-4 клітин з використанням лентівірусної трансдукції IMAB362 мішені CLDN18.2 (NCI-N87~CLDN18.2 і NUGC-4~CLDN18.2).

NCI-N87~CLDN18.2 пухлинні ксенотрансплантати інокулювали підшкірною ін'єкцією 1×10^7 NCI-N87~CLDN18.2 клітин у бік 8 "голих" мишей (самки, 6-тижневого віку) на лікувальну групу. Обробку починали на 5 день після інокулювання пухлини за допомогою внутрішньовенної ін'єкції 800 мкг IMAB362 або 200 мкл 0,9 % NaCl у контрольній групі (фізрозчин). Внутрішньовенне введення проводили щотижня протягом усього періоду спостереження. Розмір пухлини й стан здоров'я тварин реєстрували два рази на тиждень. Фігура 22a показує вплив обробки IMAB362 на ріст пухлини. Розмір підшкірних пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM, *** $p < 0,001$). Фігура 22b показує графіки виживання Каплана-Мейера. Мишей забивали, коли пухлини досягали розміру 1400 мм³.

Таким чином, тривала IMAB 362-обробка високозначимо інгібувала ($p < 0,001$) пухлинний ріст NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантатів раку шлунка (Фігура 22a). Затримка росту пухлини була значимою ($p < 0,05$) пов'язана з більш тривалим часом виживання мишей, яких лікували IMAB362 (Фігура 22b).

IMAB362 імунотерапія швидкозростаючих NUGC-4~CLDN18.2 ксенотрансплантатів приводила до значимого ($p < 0,05$) зменшення розмірів пухлин на 14 день лікування. Після перших двох тижнів IMAB 362-лікування розвиток NUGC-4~CLDN18.2 пухлини був дуже агресивним. Однак, інгібування росту NUGC-4~CLDN18.2 пухлини до 14 дня лікування приводило до значимого ($p < 0,05$) більш тривалого виживання мишей, яких лікували IMAB362.

У підсумку, IMAB362 було високоефективним при лікуванні ксенотрансплантатів карциноми шлунка, демонструючи значиму затримку розвитку пухлини й тривале виживання на пухлинних моделях, позитивних у відношенні ендогенного CLDN18.2. На моделях дуже агресивних пухлин ці протипухлинні ефекти IMAB362 є менш вираженими, але, проте, значними, що підкреслює сильні протипухлинні властивості IMAB362.

Приклад 15: Протипухлинні ефекти IMAB362 у комбінації з хіміотерапією на мишачих моделях пухлин

In vitro, IMAB 362-опосередкований ADCC є більш ефективним на клітинах раку шлунка людини, попередньо оброблених комбінаціями хіміотерапевтичних засобів, включаючи EOF і 5-FU+OX. Тому, протипухлинна дія комбінації цих сполук із IMAB362 була досліджена на мишачих пухлинних моделях in vivo.

NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантати пухлин інокулювали за допомогою підшкірної ін'єкції 1×10^7 NCI-N87~CLDN18.2 клітин у бік 9 мишей у кожній лікувальній групі. Мишей-носіїв пухлин лікували відповідно до режиму EOF-1,25 мг/кг епірубіцину, 3,25 мг/кг оксалиплатину й 56,25 мг/кг 5-фторурацилу внутрішньочеревинно в дні 4, 11, 18 і 25 після інокулювання пухлини, з наступної внутрішньовенною ін'єкцією 800 мкг IMAB362 через 24 години після введення хіміотерапії. IMAB 362-обробку продовжували щотижня. Розмір пухлини й стан здоров'я тварин контролювали два рази на тиждень. Фігура 23a показує вплив комбінованого лікування на ріст пухлини. Розмір підшкірних пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє значення + SEM; * $p < 0,05$). Фігура 23b показує графіки виживання Каплана-Мейера. Мишей забивали, коли об'єм пухлини досягав 1400 мм³.

В "голих" мишей з пухлиною NCI-N87~CLDN18.2 при лікуванні IMAB362 або EOF режимом спостерігалось високозначиме пригнічення росту пухлини в порівнянні з контрольними мишами. Додаткове IMAB362 лікування в комбінації з EOF хіміотерапією приводило до значимого ($p < 0,05$) більш сильного інгібування росту пухлини, ніж лікування EOF режимом окремо (Фігура 23a). Медіана виживання мишей у контрольній групі (фізрозчин) становила 59 днів. Щотижневе IMAB 362-лікування мишей значно збільшувало медіану виживання до 76 днів, подібно до виживання мишей в EOF групі з медіаною виживання теж 76 днів. Однак комбіноване лікування IMAB362 і EOF збільшувало медіану виживання до 81 дня (Фігура 23b).

Ксенотрансплантати пухлин інокулювали підшкірною ін'єкцією 1×10^7 NUGC-4~CLDN18.2 клітин у бік 10 "голим" мишам (самки, 6-тижневого віку) на лікувальну групу. Мишей лікували в дні 3, 10, 17 і 24 хіміотерапевтичними засобами. IMAB 362-обробку проводили щотижня. Фігура

24a показує криві росту підшкірних ксенотрансплантатів NUGC-4~CLDN18.2 пухлин (середнє + SEM). Фігура 24b представляє графіки виживання Каплана-Мейера (логарифмічний ранговий (Коксу-Мантеля) тест, ** $p < 0,01$).

Підшкірні ксенотрансплантати NUGC-4~CLDN18.2 пухлин розвивалися дуже агресивно. Проте, ІМАВ 362-лікування мишей-носіїв пухлин значно інгібувало ріст пухлини в порівнянні з контрольною групою із уведенням фізрозчину. При використанні комбінованої терапії EOF, вплив ІМАВ362 на ріст пухлини NUGC-4~CLDN18.2 був прихований інгібуванням росту внаслідок EOF-лікування, не демонструючи збільшення інгібування росту пухлини в порівнянні з лікуванням EOF окремо (Фігура 24a). Однак, медіана виживання мишей, яких лікували ІМАВ362 і EOF режимом, була збільшена з високою значимістю ($p < 0,01$) у порівнянні з виживанням мишей, яких лікували тільки EOF (Фігура 24b).

Приклад 16: Вирощені в присутності ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 Т-клітини поліпшують ІМАВ 362-опосередкований контроль розвинених пухлин in vivo

Для дослідження комбінованої активності ІМАВ362 і отриманих у результаті обробки ZA/IL-2 $\gamma\delta$ Т-клітин у мишачих системах ми використовували мишей NSG. У мишей NSG відсутні зрілі Т-клітини, В-клітини, натуральні кілери (NK), сигнальні шляхи багатьох цитокінів, і вони мають безліч дефектів уродженого імунітету, при тому, що ніші в первинній і вторинній імунологічних тканинах є доступними для колонізації людськими імунними клітинами.

NSG мишам підшкірно інокулювали 1×10^7 CLDN18.2-трансфікованих HEK293 клітин. У той же день миші одержували 8×10^6 людських PBMCs, збагачених V γ 9V δ 2 Т-клітинами, культивованими протягом 14 днів у середовищі з додаванням ZA. Більше того, мишам вводили 50 мкг/кг ZA і 5000 U IL-2 (Proleukin). Для збереження людських Т-клітин у функціональному стані, IL-2 вводили два рази на тиждень, а ZA – щотижня. Коли HEK293~CLDN18.2 пухлини ставали макроскопічно видимими, починали лікування 200 мкг ІМАВ362 два рази на тиждень. На додачу до групи з 9 яких лікували мишей, були взяті також дві контрольні групи мишей. Одна група не одержувала людські $\gamma\delta$ Т-клітини, іншу групу лікували ізотиповими контрольними антитілами замість ІМАВ362. Ріст CLDN18.2-позитивних пухлин у мишей, яких лікували ІМАВ362 у присутності людських $\gamma\delta$ Т-клітин і ZA, був значимо інгібований і практично припинений, у той час як у мишей, яких лікували або ізотиповими контрольними антитілами, або в мишей, позбавлених людських Т-клітинних ефекторів, пухлини росли агресивно, і тому мишей забивали раніше призначеного часу (Фігура 25).

Приклад 17: Протипухлинні ефекти ІМАВ362 у комбінації з хіміотерапією на мишачих пухлинних моделях

Протипухлинна активність ІМАВ362 у комбінації з хіміотерапією була досліджена на підшкірних алотрансплантатах карциноми шлунка в імунокомпетентних безпородних NMRI мишей з використанням CLS-103 клітин з лентивірусною трансдукцією мишачого cldn18.2 (CLS-103~cldn18.2).

CLS-103~cldn18.2 алотрансплантат пухлини інокулювали за допомогою підшкірної ін'єкції 1×10^6 CLS-103~cldn18.2 клітин у бік NMRI-мишей (10 мишей на кожну лікувальну групу). Мишей-носіїв пухлин лікували внутрішньоочеревинним уведенням 1,25 мг/кг епірубіцину, 3,25 мг/кг оксаліплатину й 56,25 мг/кг 5-фторурацилу (EOF) у дні 3, 10, 17 і 24 після інокулювання пухлини, з наступною внутрішньовенною ін'єкцією 800 мкг ІМАВ362 через 24 години після введення хіміотерапії. IL-2 вводили два рази на тиждень за допомогою підшкірної ін'єкції 3000 IE. Після завершення хіміотерапії обробку ІМАВ362 і IL-2 продовжували протягом усього періоду спостереження. Розмір пухлини й стан здоров'я тварин контролювали два рази на тиждень. Мишей забивали, коли пухлина досягала об'єму 1400 мм³ або коли з'являлася виразка пухлини.

Як видно на Фігурі 26, в NMRI мишей з CLS-103~cldn18.2 пухлинами, які лікувались ІМАВ362 або EOF окремо, не спостерігалось значимого інгібування росту пухлини в порівнянні з контрольною групою (фізрозчин). На противагу до цього, комбінація EOF хіміотерапії й ІМАВ 362-лікування призводила до значно більш високого інгібування росту пухлини й тривалого виживання мишей-носіїв пухлин. Це спостереження демонструє наявність адитивних (сукупних) або навіть синергійних (взаємно посилюючих) ефектів при комбінації EOF хіміотерапії й ІМАВ362 імунотерапії. Обробка IL-2 не впливала на ріст пухлини.

Агенти заявника реєстраційний номер: 342-75 PCT	Міжнародна заявка No.
----------------------------------------------------	-----------------------

**ВКАЗІВКИ, ЩО СТОСУЮТЬСЯ ДЕПОНОВАНОГО МІКРООРГАНІЗМУ АБО ІНШОГО
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**

(правило PCT 13bis)

A. Вказівки, зроблені нижче, стосуються депонованого мікроорганізму або іншого біологічного матеріалу, про який йдеться в описі на сторінці <u>40</u> , в рядок <u>1</u>	
B. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ДЕПОЗИТУ Наступні депозити вказані на додатковому аркуші Назва депозитарію DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Адреса депозитарію (включаючи поштовий код і країну) Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig DE	
Дата депонування 19 жовтня 2005 року	Обліковий номер DSM ACC2737
C. ДОДАТКОВІ ВКАЗІВКИ (залиште незаповненим, якщо не застосовується)	Ця інформація продовжується на додатковому аркуші.
- Мишача (<i>Mus musculus</i>) мієлома P3X63Ag8U.1, злита с мишачими (<i>Mus musculus</i>) спленоцитами - Гібридома, яка секретує антитіло до людського клаудину-18A2	
D. ВИЗНАЧЕНІ КРАЇНИ, ЯКИХ СТОСУЮТЬСЯ ВКАЗІВКИ (якщо вказівки стосуються не всіх країн)	
E. ОКРЕМЕ НАДАННЯ ВКАЗІВОК (не заповнювати, якщо не застосовується) Вказівки, перераховані нижче, будуть подані в Міжнародне Бюро пізніше (опис загального характеру вказівок, наприклад, «Обліковий Номер Депозиту»	
Тільки для використання отримуючим закладом	Тільки для використання Міжнародним Бюро
Даний лист був потриманий разом з міжнародною заявкою	Даний лист був отриманий Міжнародним бюро:
Уповноважена посадова особа	Уповноважена посадова особа

Нова міжнародна Патентна Заявка Ganymed Pharmaceuticals AG, et al.
 "КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИТІЛ ДО КЛАУДИНУ 18.2 ДЛЯ
 ЛІКУВАННЯ РАКУ"

OurRef.: 342-75 PCT

5 Додатковий лист для Біологічного матеріалу

Ідентифікація наступних депозитів:

1) Назва і адреса депозитарію (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM
 ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM
 ACC2748):

10 DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1b
 38124 Braunschweig DE

2) Назва і адреса депозитарію (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810):

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7 B 38124
 Braunschweig DE

15

Дата депонування	Облікові Номери	Сторінка опису, стосовно депонованого мікроорганізму
19 жовтня 2005 року	DSMACC2738	Стор. 53, рядок 5
19 жовтня 2005 року	DSM ACC2739	Стор. 53, рядок 7
19 жовтня 2005 року	DSM ACC2740	Стор. 53, рядок 9
19 жовтня 2005 року	DSMACC2741	Стор. 53, рядок 11
19 жовтня 2005 року	DSM ACC2742	Стор. 53, рядок 13
19 жовтня 2005 року	DSM ACC2743	Стор. 53, рядок 15
17 листопада 2005 року	DSM ACC2745	Стор. 53, рядок 17
17 листопада 2005 року	DSM ACC2746	Стор. 53, рядок 19
17 листопада 2005 року	DSM ACC2747	Стор. 53, рядок 21
17 листопада 2005 року	DSM ACC2748	Стор. 53, рядок 23
26 жовтня 2005 року	DSMACC2808	Стор. 53, рядок 25
26 жовтня 2006 року	DSM ACC2809	Стор. 53, рядок 27
26 жовтня 2006 року	DSMACC2810	Стор. 53, рядок 29

Додаткові вказівки для всіх вищевказаних депозитів:

Мишача (Mus musculus) міелома P3X63Ag8U.1 злита з мишачими (Mus musculus)
 спленоцитами

20

Антитіло, яке секретує гібридома до людського клаудину-18A2

3) Депозитор:

Всі вищевказані депозити зроблені:

Ganymed Pharmaceuticals AG FreiligrathstraBe 12 55131 Mainz DE

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ

<120> КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИТІЛ ДО КЛАУДИНУ 18.2 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

<130> 342-75 РСТ

<150> РСТ/EP2012/002211

<151> 2012-05-23

<160> 50

<170> Патентована версія 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 1

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
1 5 10 15

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
165 170 175

Сторінка

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190
Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205
Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220
Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240
Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255
Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 2
<211> 261
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> Homo sapiens (людина розумна)
<400> 2

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

145				150				155				160			
Met	Val	Gln	Thr	Val ₁₆₅	Gln	Thr	Arg	Tyr	Thr ₁₇₀	Phe	Gly	Ala	Ala	Leu ₁₇₅	Phe
Val	Gly	Trp	Val ₁₈₀	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr ₁₈₅	Leu	Ile	Gly	Gly	Val ₁₉₀	Met	Met
Cys	Ile	Ala ₁₉₅	Cys	Arg	Gly	Leu	Ala ₂₀₀	Pro	Glu	Glu	Thr	Asn ₂₀₅	Tyr	Lys	Ala
Val	Ser ₂₁₀	Tyr	His	Ala	Ser	Gly ₂₁₅	His	Ser	Val	Ala	Tyr ₂₂₀	Lys	Pro	Gly	Gly
Phe ₂₂₅	Lys	Ala	Ser	Thr	Gly ₂₃₀	Phe	Gly	Ser	Asn	Thr ₂₃₅	Lys	Asn	Lys	Lys	Ile ₂₄₀
Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala ₂₄₅	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu ₂₅₀	Val	Gln	Ser	Tyr	Pro ₂₅₅	Ser
Lys	His	Asp	Tyr ₂₆₀	Val											

```
<210> 3
<211> 10
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 3
```

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
1 5 10

```
<210> 4
<211> 11
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 4
```

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
1 5 10

<210>	5
<211>	14
<212>	PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213>	Номо sapiens (Людина розумна)
<400>	5

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
1 5 10

```
<210> 6
<211> 13
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> Homo sapiens (Людина розумна)
```

Сторінка

<400> 6

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 7

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile
1 5 10

<210> 8

<211> 55

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 8

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

<210> 9

<211> 24

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 9

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys
1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (Людина розумна)

<400> 10

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr
1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
Сторінка

20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 11
<211> 153
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> Homo sapiens (людина розумна)
<400> 11

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
50 55 60

Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
65 70 75 80

Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
85 90 95

Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
100 105 110

Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
115 120 125

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
130 135 140

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 12
<211> 107
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна
<220>
<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР
<400> 12

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
Сторінка

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

<210> 13
 <211> 326
 <212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
 <213> штучна

<220>
 <223> опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 13

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

Сторінка

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 14

<211> 466

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 14

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
Сторінка

35	40	45
Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu	50	55 60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn	65	70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	85	90 95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	100	105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	115	120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	130	135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	145	150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	165	170 175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	180	185 190
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	195	200 205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	210	215 220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	225	230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	245	250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	260	265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	275	280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	290	295 300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		

Сторінка

305				310				315				320			
Val	Val	Ser	Val	Leu 325	Thr	Val	Leu	His	Gln 330	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 335	Lys
Glu	Tyr	Lys	Cys 340	Lys	Val	Ser	Asn	Lys 345	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro 350	Ile	Glu
Lys	Thr	Ile 355	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 360	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro 365	Gln	Val	Tyr
Thr	Leu 370	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp 375	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn 380	Gln	Val	Ser	Leu
Thr 385	Cys	Leu	Val	Lys	Gly 390	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 395	Ile	Ala	Val	Glu	Trp 400
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln 405	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr 410	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro 415	Val
Leu	Asp	Ser	Asp 420	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu 425	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr 430	Val	Asp
Lys	Ser	Arg 435	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn 440	Val	Phe	Ser	Cys	Ser 445	Val	Met	His
Glu	Ala 450	Leu	His	Asn	His	Tyr 455	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu 460	Ser	Leu	Ser	Pro

Gly Lys
465

```
<210> 15
<211> 467
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна
```

<220>
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 15

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Сторінка

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Сторінка

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 16

<211> 465

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 16

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
Сторінка

				85					90					95		
Thr	Ala	Tyr	Met 100	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu 105	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser 110	Ala	Val	
Tyr	Phe	Cys 115	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly 120	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp 125	Gly	Gln	Gly	
Thr	Thr 130	Leu	Thr	Val	Ser	Ser 135	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly 140	Pro	Ser	Val	Phe	
Pro 145	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser 150	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly 155	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu 160	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys 165	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu 170	Pro	Val	Thr	Val	Ser 175	Trp	
Asn	Ser	Gly	Ala 180	Leu	Thr	Ser	Gly 185	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala 190	Val	Leu	
Gln	Ser	Ser 195	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu 200	Ser	Ser	Val	Val	Thr 205	Val	Pro	Ser	
Ser	Ser 210	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 215	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val 220	Asn	His	Lys	Pro	
Ser 225	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 230	Lys	Lys	Val	Glu	Pro 235	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys 240	
Thr	His	Thr	Cys	Pro 245	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro 250	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly 255	Pro	
Ser	Val	Phe	Leu 260	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 265	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 270	Ile	Ser	
Arg	Thr	Pro 275	Glu	Val	Thr	Cys	Val 280	Val	Val	Asp	Val	Ser 285	His	Glu	Asp	
Pro	Glu 290	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 295	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 300	Glu	Val	His	Asn	
Ala 305	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 310	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 315	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 320	
Val	Ser	Val	Leu	Thr 325	Val	Leu	His	Gln	Asp 330	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 335	Glu	
Tyr	Lys	Cys	Lys 340	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 345	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 350	Glu	Lys	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	

355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 17
 <211> 467
 <212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
 <213> штучна
 <220>
 <223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла
 <400> 17
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

сторінка

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Сторінка

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 18

<211> 466

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 18

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val
1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu
65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
Сторінка

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

Стопінка

405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460
 Gly Lys
 465
 <210> 19
 <211> 469
 <212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
 <213> штучна
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла
 <400> 19
 Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
 20 25 30
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
 35 40 45
 Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
 50 55 60
 Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr
 65 70 75 80
 Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser
 85 90 95
 Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Сторінка

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

Сторінка

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 20

<211> 240

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 20

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
Сторінка

180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 21
<211> 235
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 21

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Сторінка

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 22

<211> 234

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 22

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
сторінка

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 23
<211> 240
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 23

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Сторінка

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 24

<211> 240

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 24

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
Сторінка

145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 25
<211> 239
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 25

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

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Сторінка

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 26

<211> 240

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 26

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
100 105 110

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
Сторінка

130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 27
<211> 240
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 27

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Сторінка

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 28

<211> 234

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 28

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
Сторінка

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 29
<211> 117
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

сторінка

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 30
<211> 118
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 30

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 116
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 31

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Сторінка

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

Сторінка

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 33

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

<210> 34

<211> 120

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 34

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

85

90

95

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 35

<211> 113

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 35

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 36

<211> 106

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 36

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

Сторінка

20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 107
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 113
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР
Сторінка

<400> 38

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 39

<211> 113

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 39

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Сторінка

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 40

<211> 112

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 40

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41

<211> 113

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 41

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Сторінка

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln
85 90 95

Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 42
<211> 113
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

<220>
<223> Опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР
<400> 42

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 107
<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)
<213> штучна

Сторінка

<220>

<223> опис штучної послідовності: трансляція продукту ПЛР

<400> 43

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 44

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Епітоп

<400> 44

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Епітоп

<400> 45

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> штучна

<220>

<223> Епітоп

Сторінка

<400> 46

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Штучна

<220>

<223> Епітоп

<400> 47

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Штучна

<220>

<223> Епітоп

<400> 48

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Штучна

<220>

<223> Епітоп

<400> 49

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT (група захисної / радикал транслокації)

<213> Штучна

<220>

<223> Епітоп

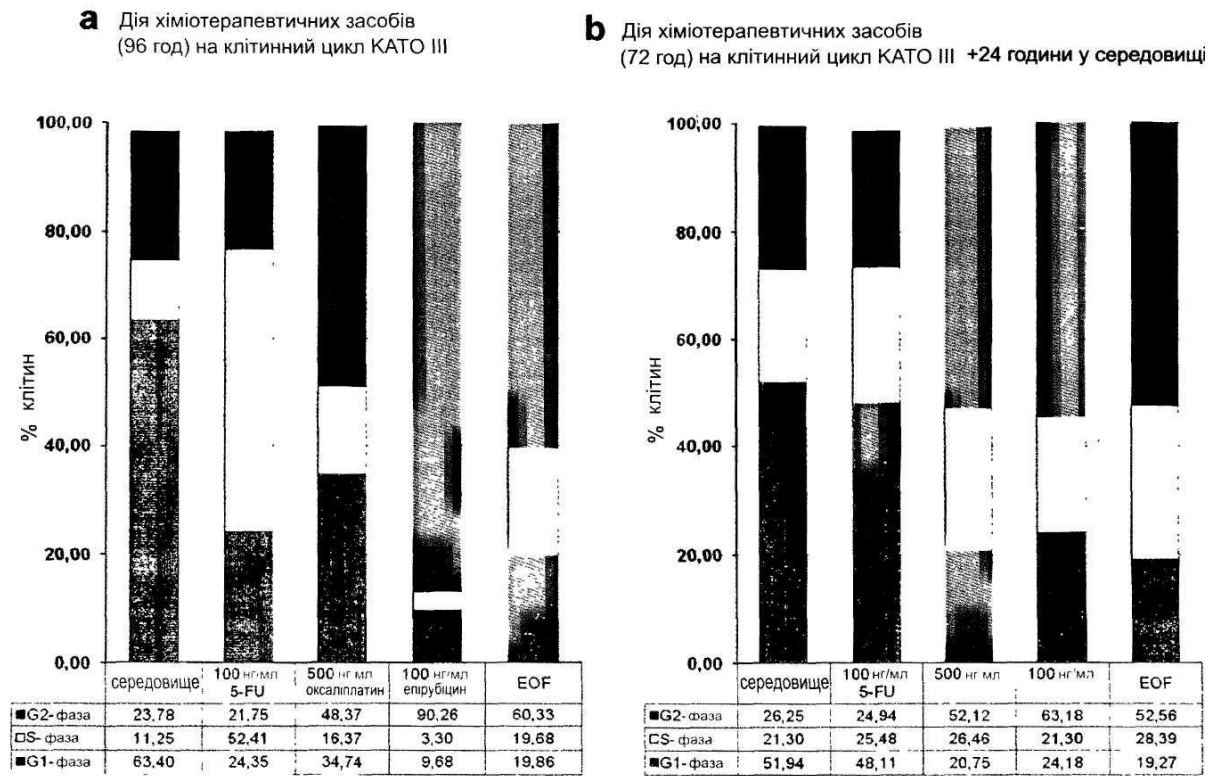
<400> 50

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly
1 5 10 15

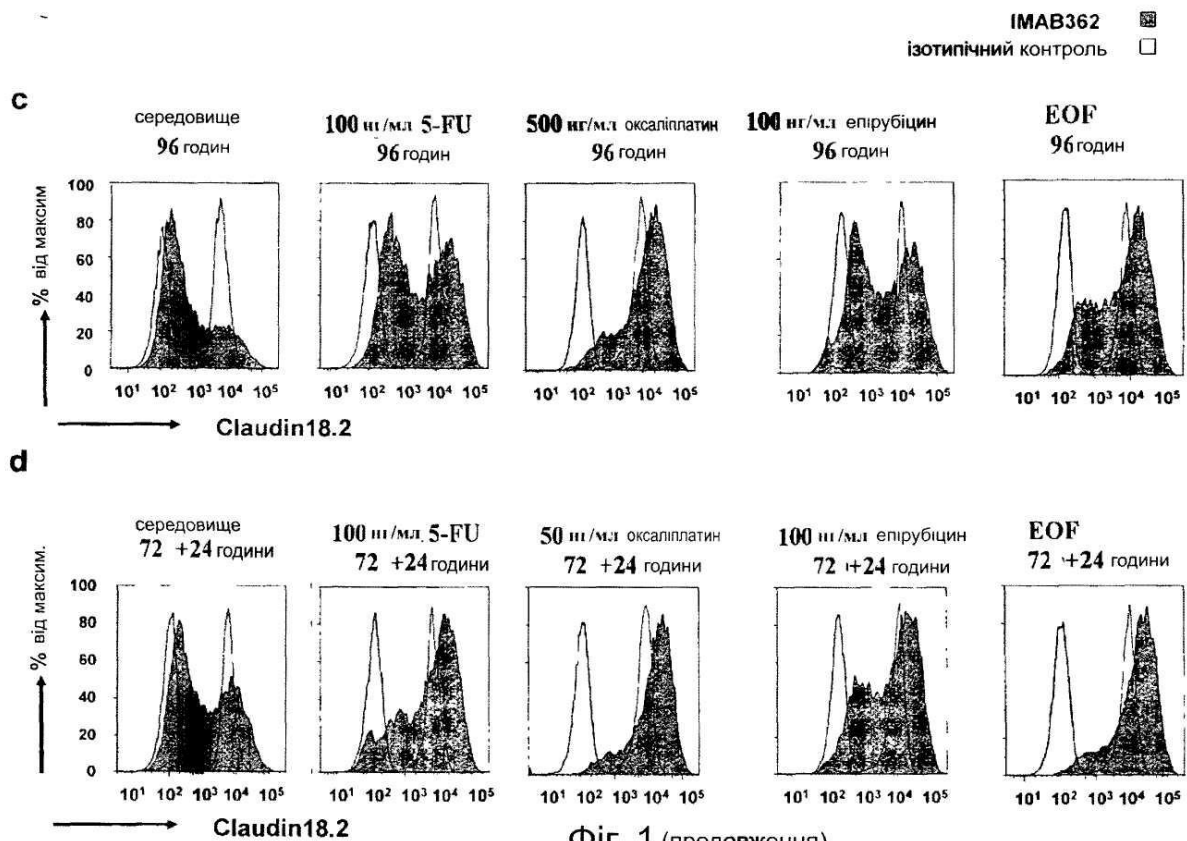
Сторінка

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

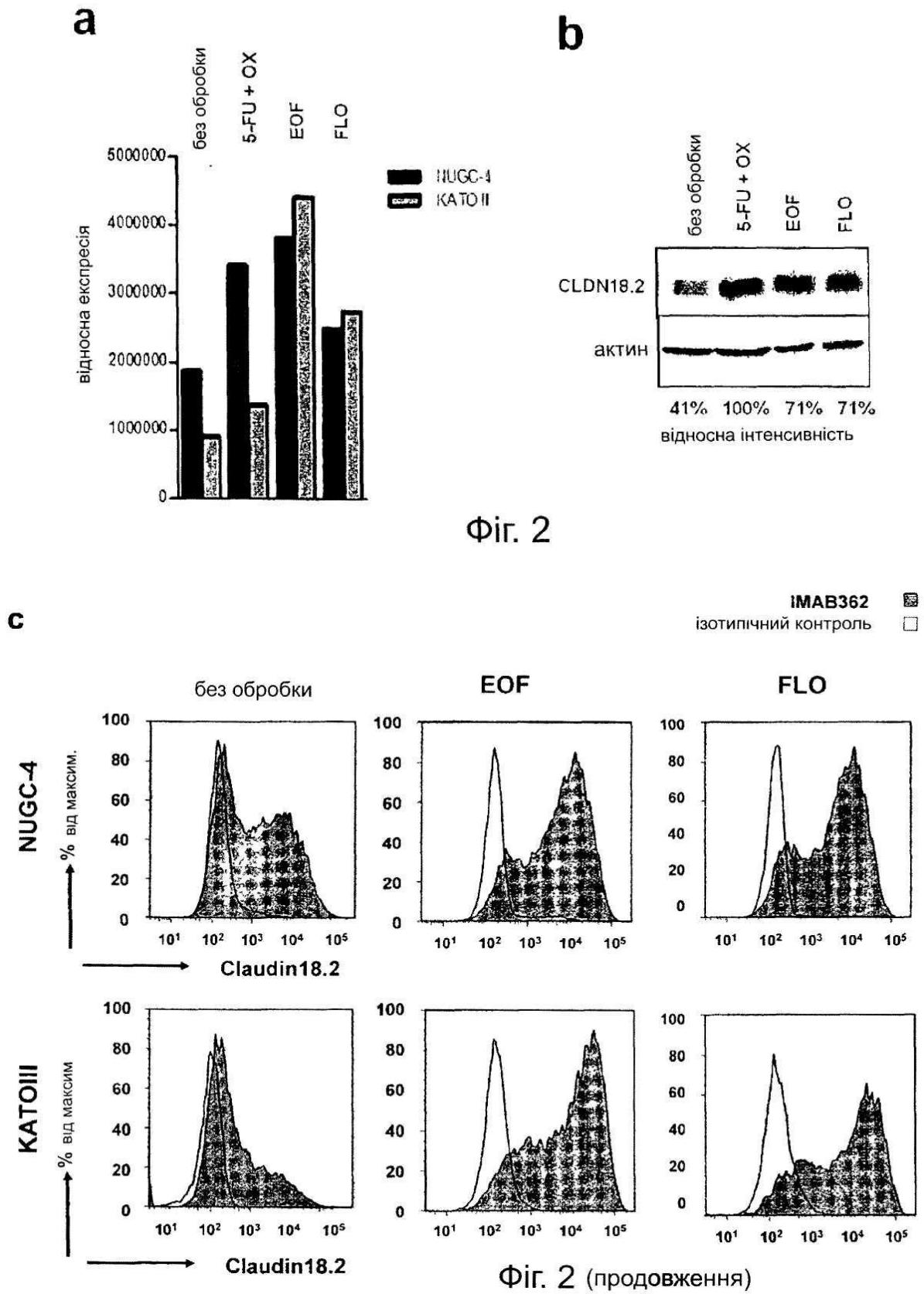
1. Спосіб лікування або запобігання раку шлунка, що характеризується злоякісними пухлинними клітинами, експресуючими CLDN18.2, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, в комбінованій терапії із засобом, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, де
 - (а) антитіло, яке зв'язує CLDN18.2 являє антитіло, здатне опосередкувати знищення клітин, експресуючих CLDN18.2 за допомогою антитілозалежної клітинноопосередкованої цитотоксичності (ADCC), опосередковуючої лізис, де антитіло включає важкий ланцюг антитіла, що включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:32 та легкий ланцюг антитіла, що включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:39; і
 - (b) агент, стимулюючий $\gamma\delta$ Т-клітини, являє собою бісфосфонат, і де бісфосфонат вводять пацієнтові в комбінованій терапії з інтерлейкіном-2.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що $\gamma\delta$ Т-клітини є V γ 9V δ 2 Т-клітинами.
3. Спосіб за будь-яким з пунктів 1 або 2, який **відрізняється** тим, що засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, є азотовмісним бісфосфонатом (амінобісфосфонатом).
4. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, який **відрізняється** тим, що засіб, який стимулює $\gamma\delta$ Т-клітини, вибирають із групи, яка складається із золедронової кислоти, клодронової кислоти, ібандронової кислоти, памідронової кислоти, ризедронової кислоти, минодронової кислоти, олпадронової кислоти, алендронової кислоти, інкадронової кислоти та їх солей.
5. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-4, який **відрізняється** тим, що комбінована терапія додатково включає введення засобу, який стабілізує або збільшує експресію CLDN18.2, де засіб, що стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2 вибирають з групи, яка складається з (i) оксиплатину і 5-фторурацилу, (ii) епирубіцину, оксаліплатину і 5-фторурацилу; (iii) 5-фторурацилу, фолінової кислоти і оксаліплатину.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що експресія CLDN18.2 спостерігається на клітинній поверхні ракової клітини.
7. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-6, який **відрізняється** тим, що антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN18.2.
8. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-7, який **відрізняється** тим, що антитіло, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, опосередковує знищення клітини за допомогою одного або більше із числа опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC) лізису, індукції апоптозу й інгібування проліферації.
9. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-8, який **відрізняється** тим, що згідно з яким важкий ланцюг антитіла включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:17, а легкий ланцюг антитіла включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 24.
10. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-9, який **відрізняється** тим, що комбінована терапія передбачає введення антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, у дозі до 1000 мг/м².
11. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-10, який **відрізняється** тим, що комбінована терапія передбачає введення антитіла, яке проявляє здатність зв'язуватися з CLDN18.2, багаторазово в дозі від 300 до 600 мг/м².
12. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-11, який **відрізняється** тим, що рак є CLDN18.2-позитивним.
13. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-12, який **відрізняється** тим, що рак шлунка є аденокарциномою, зокрема, розвитою аденокарциномою.
14. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-13, який **відрізняється** тим, що пацієнт є пацієнтом з негативним статусом за HER2/neu або пацієнтом з позитивним статусом за HER2/neu, але не придатним для лікування трастузумабом.
15. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-14, який **відрізняється** тим, що CLDN18.2 має амінокислотну послідовність згідно SEQ ID NO: 1.

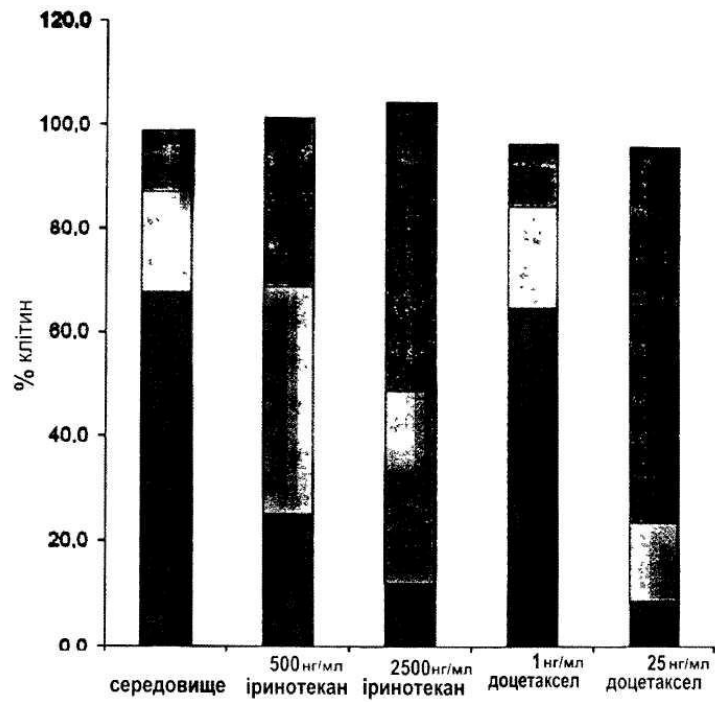


Фіг. 1



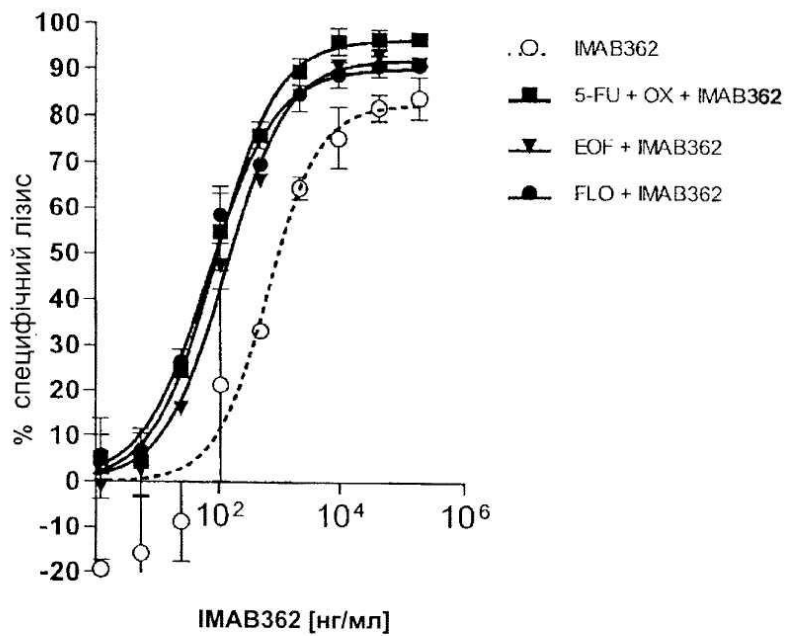
Фіг. 1 (продовження)



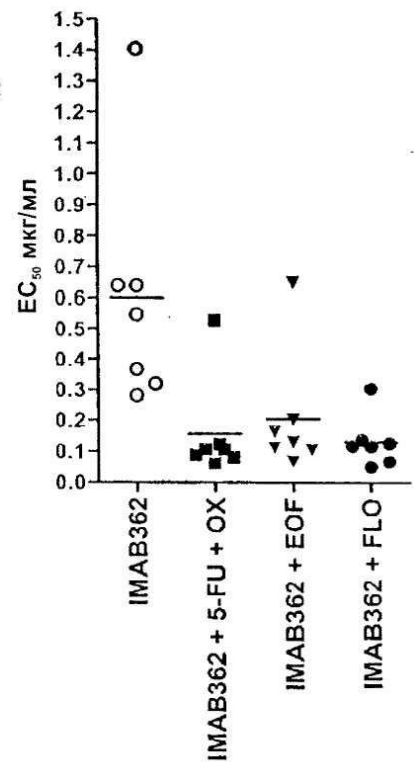


Фіг. 3

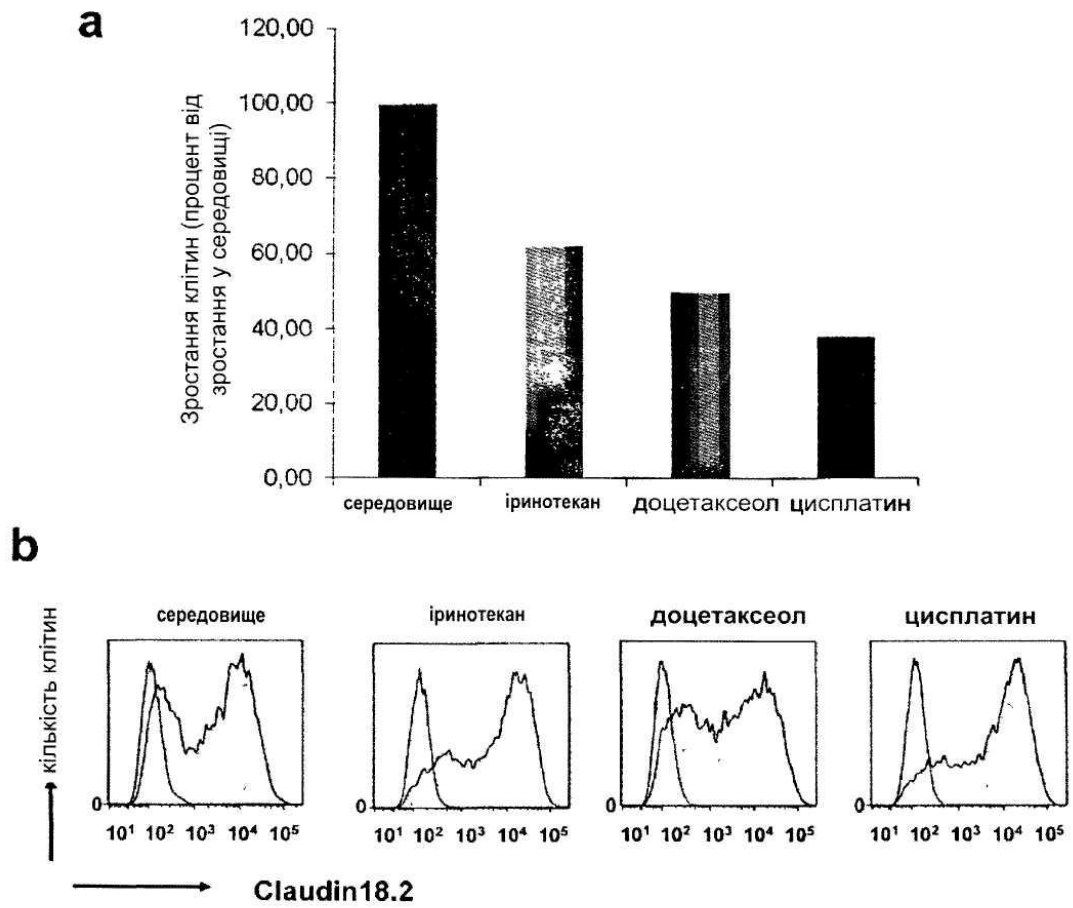
a



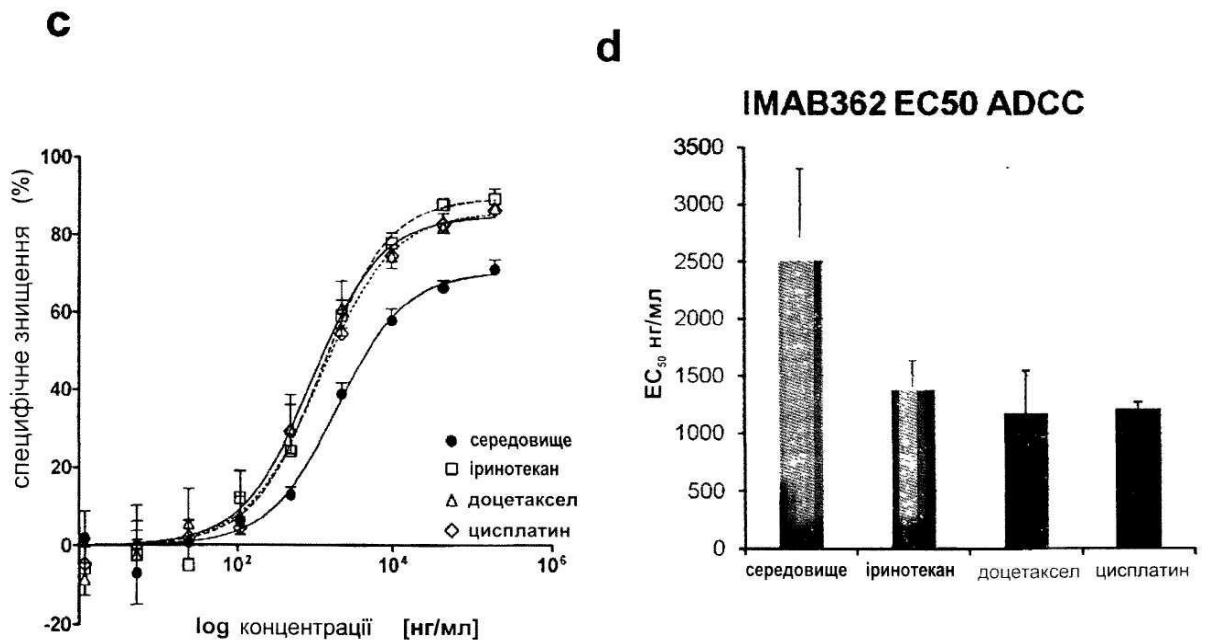
b



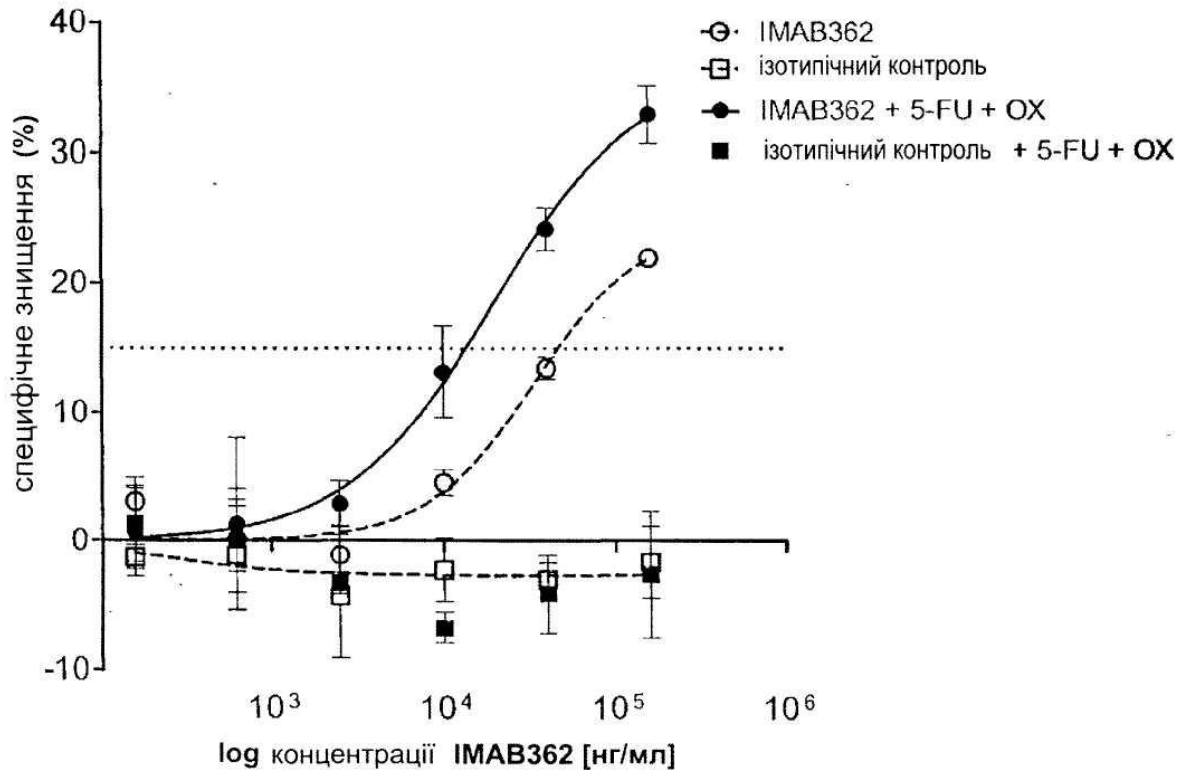
Фіг. 4



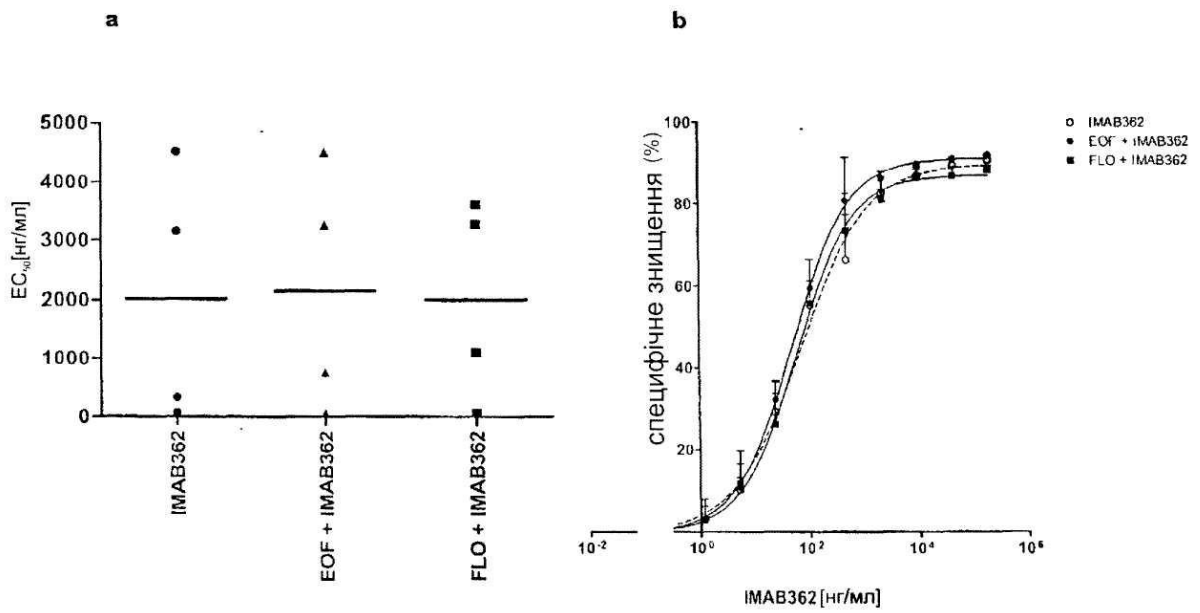
Фіг. 5



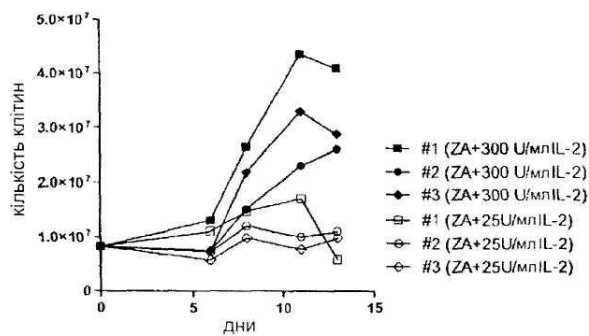
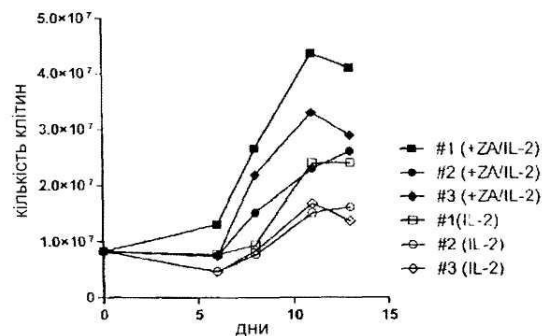
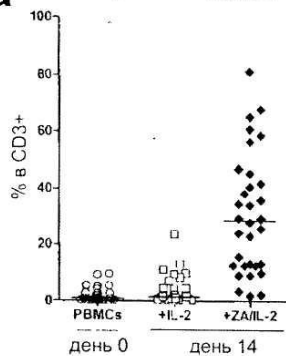
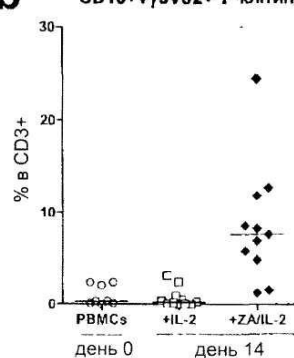
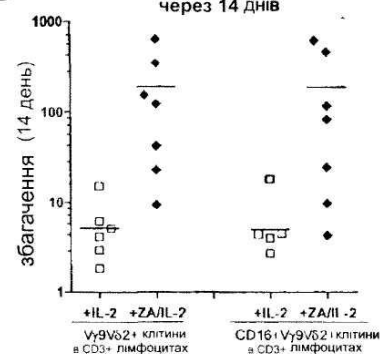
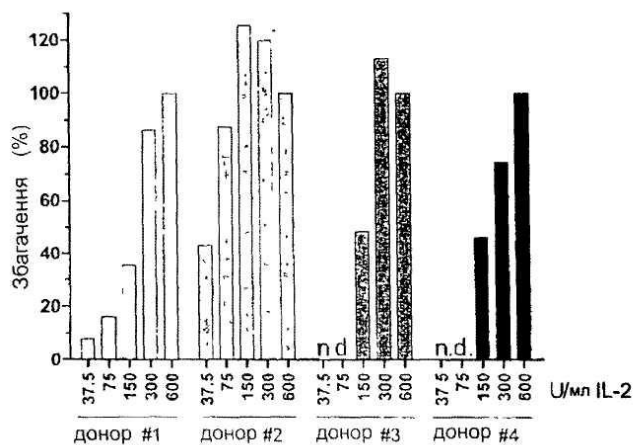
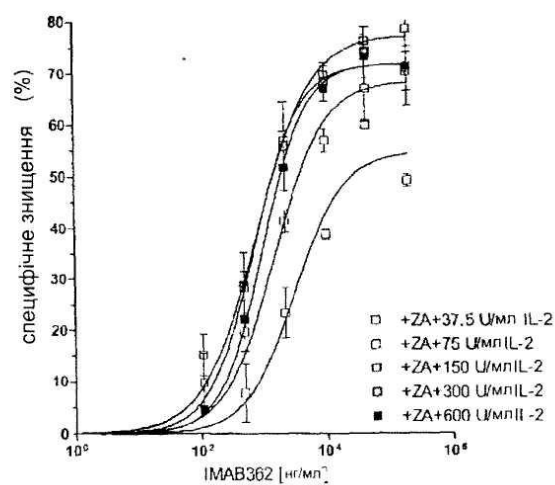
Фіг. 5 (продовження)

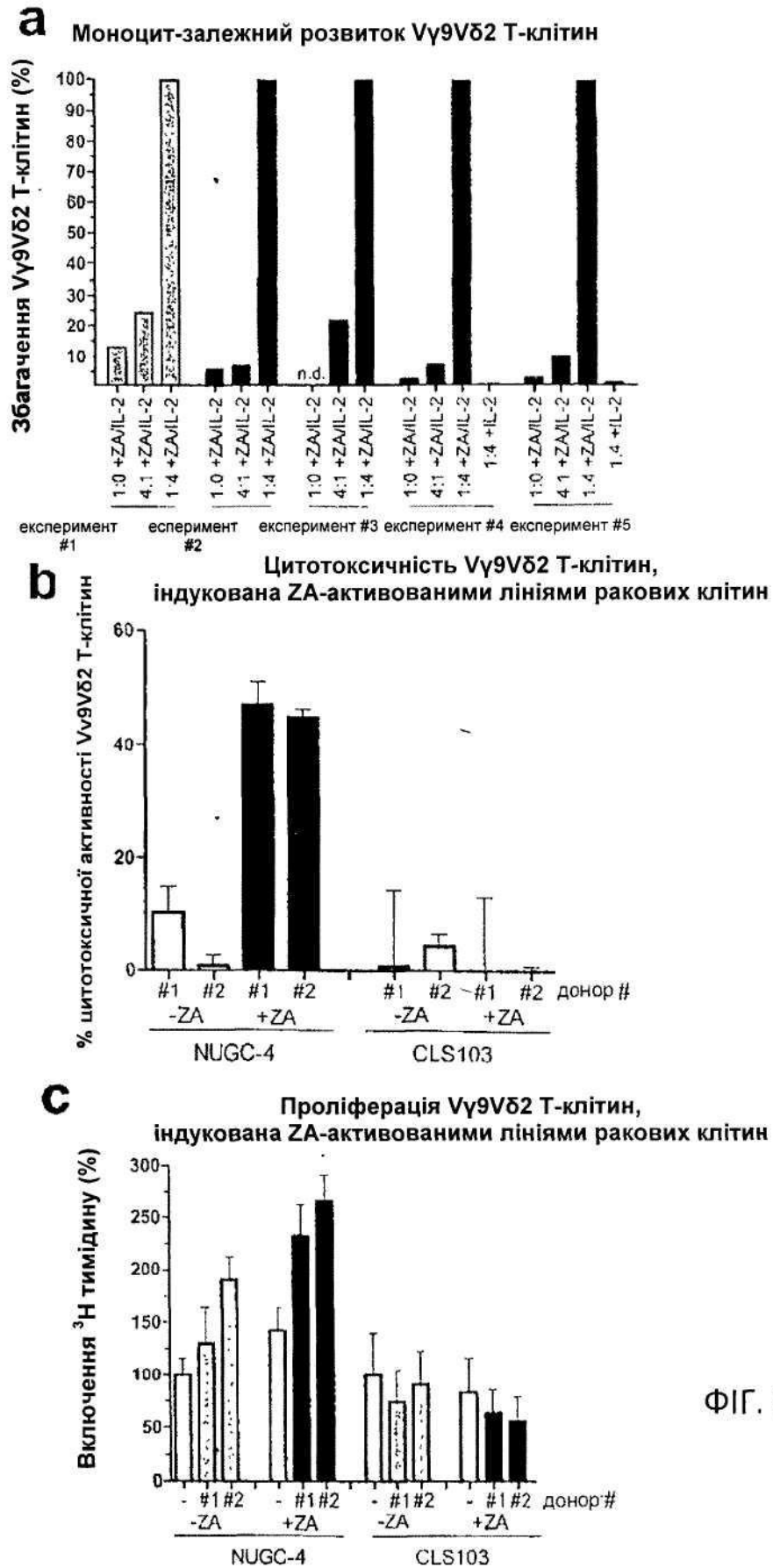


Фіг. 6

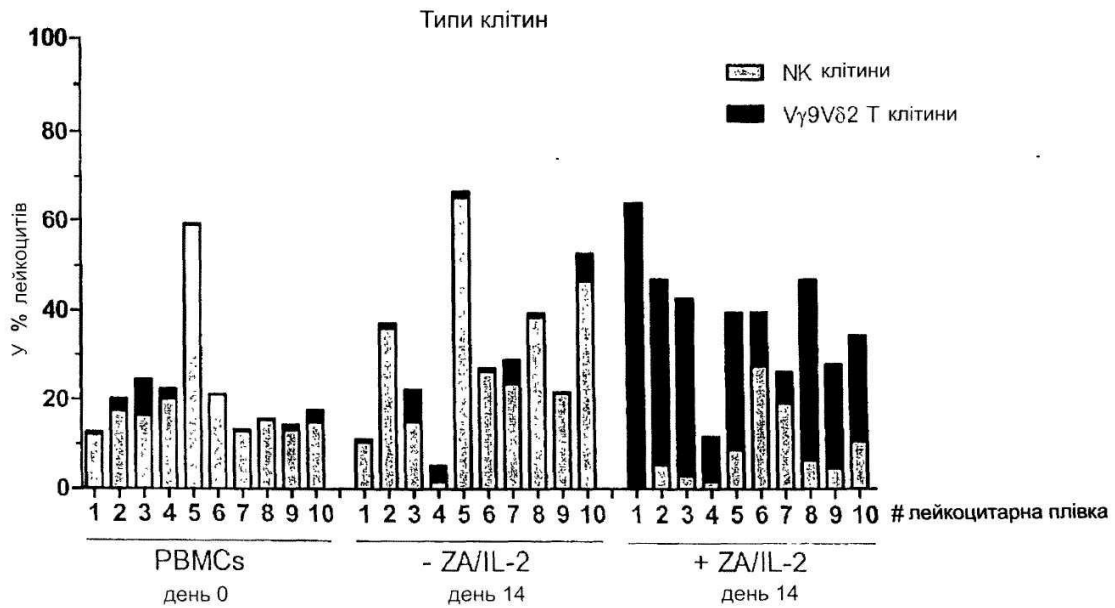


Фіг. 7

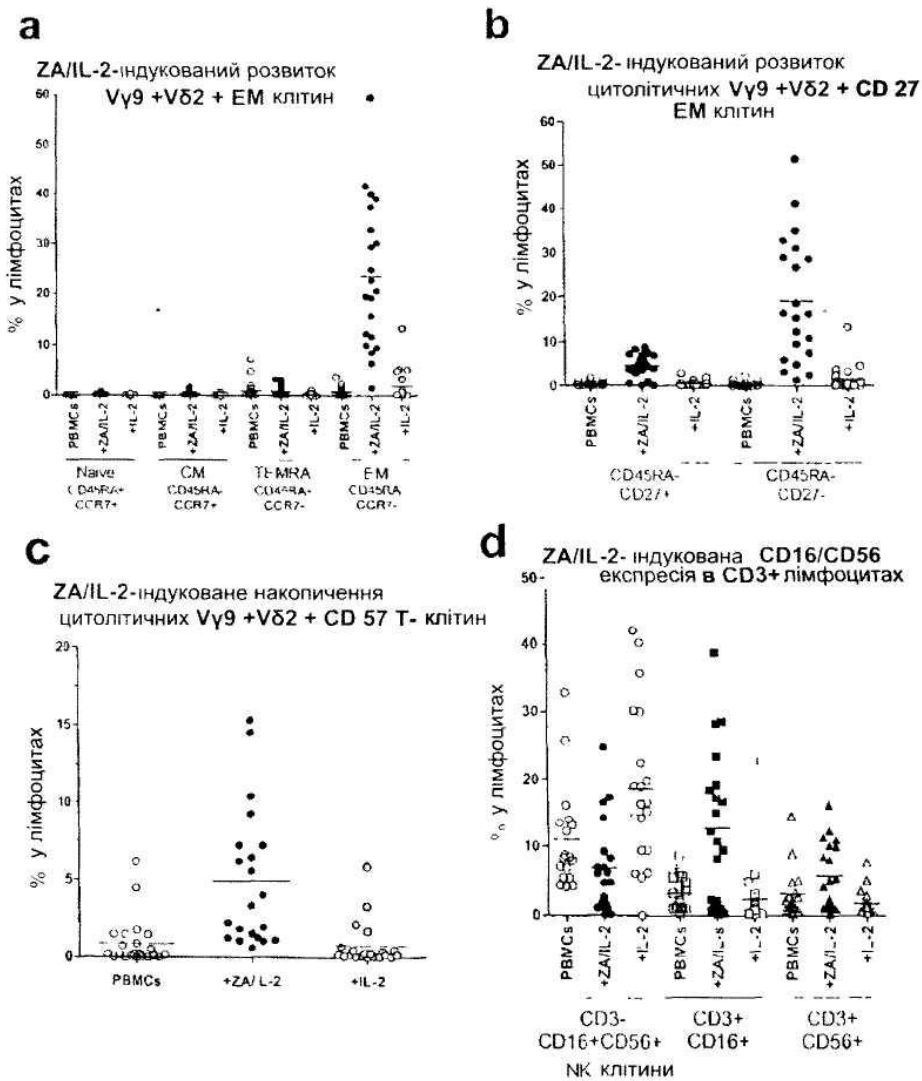
a IL-2-залежна проліферація PBMC in vitro

b ZA-залежна проліферація PBMC in vitro

Фіг. 8
a $V\gamma 9+V\delta 2$ Т-клітини

b $CD16+V\gamma 9V\delta 2$ Т-клітини

c збагачення $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клітин через 14 днів

Фіг. 9
CD16+ $V\gamma 9+V\delta 2$ Т-клітини

ADCC при використанні $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клітин та IMAB362 на NUG-4

Фіг. 10



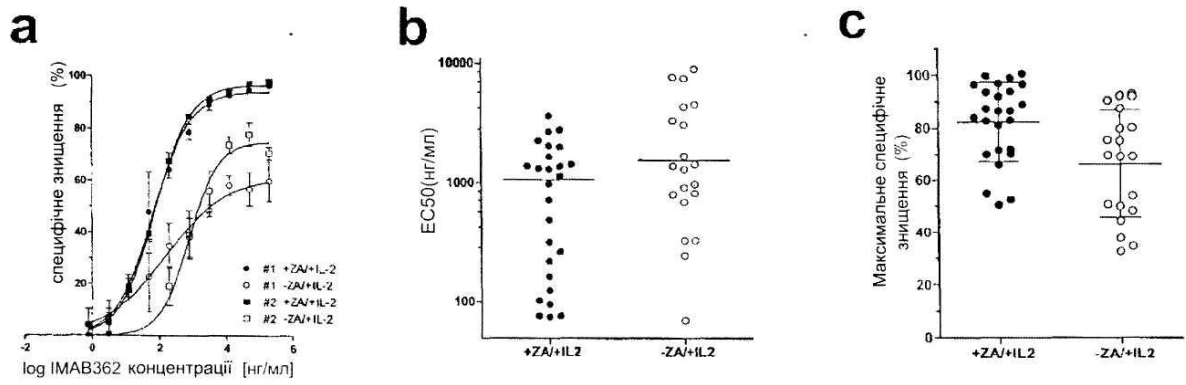
ФІГ. 11



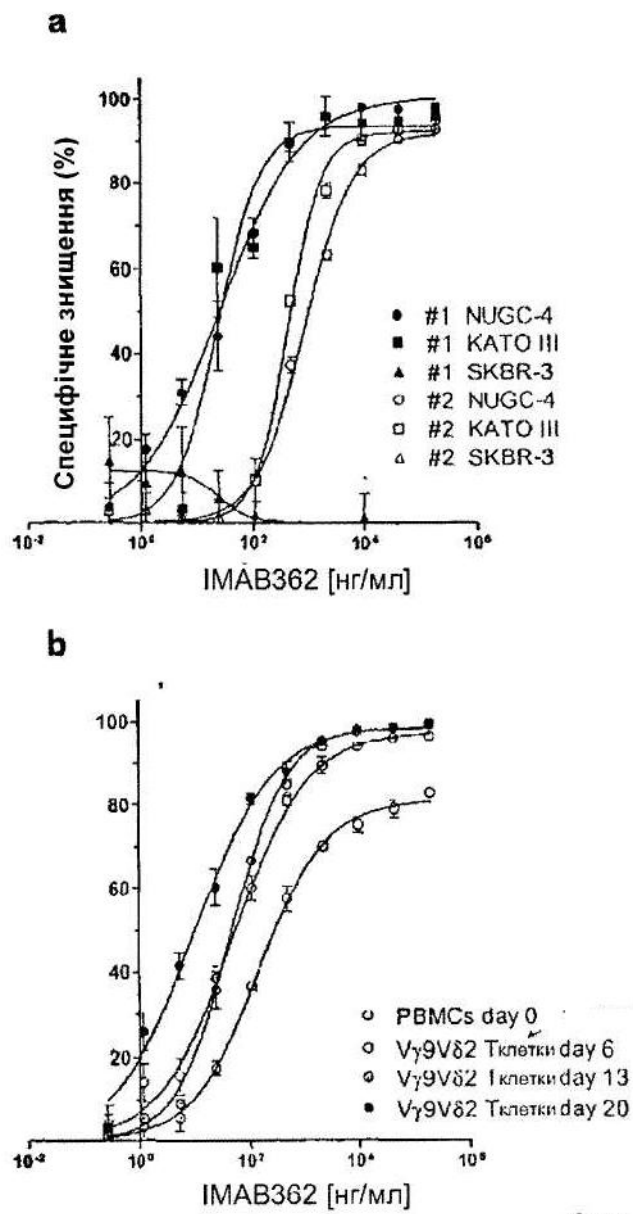
Фіг. 12



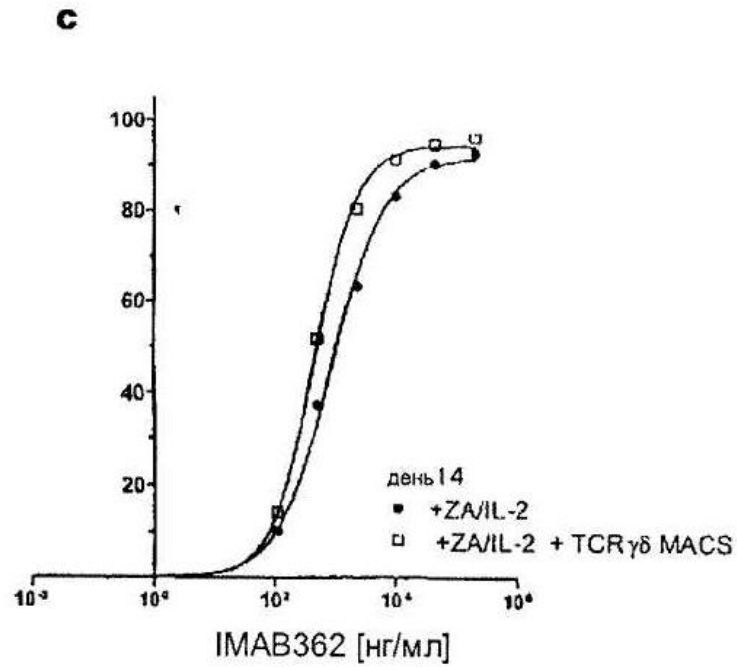
Фіг. 13



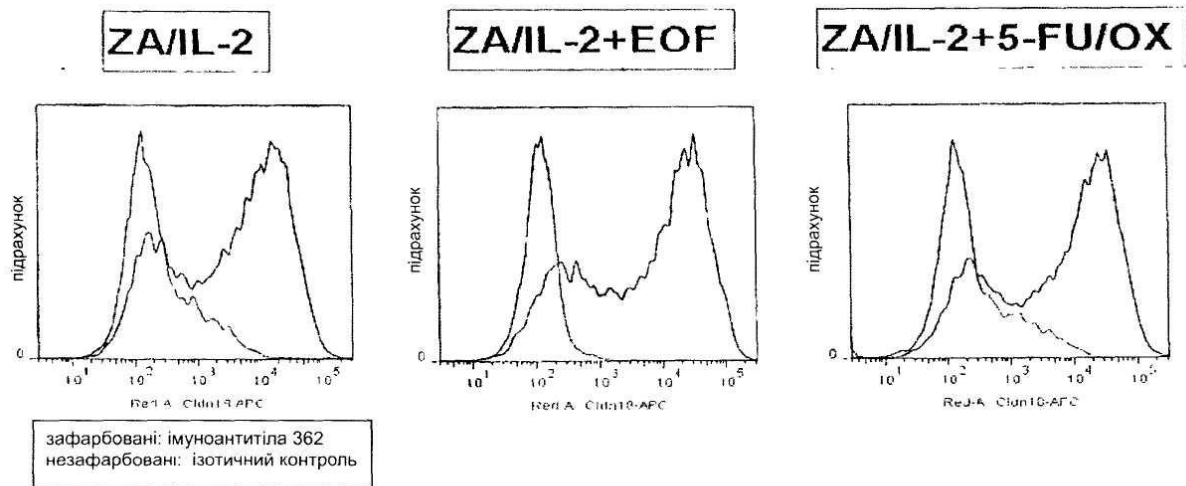
Фіг. 14



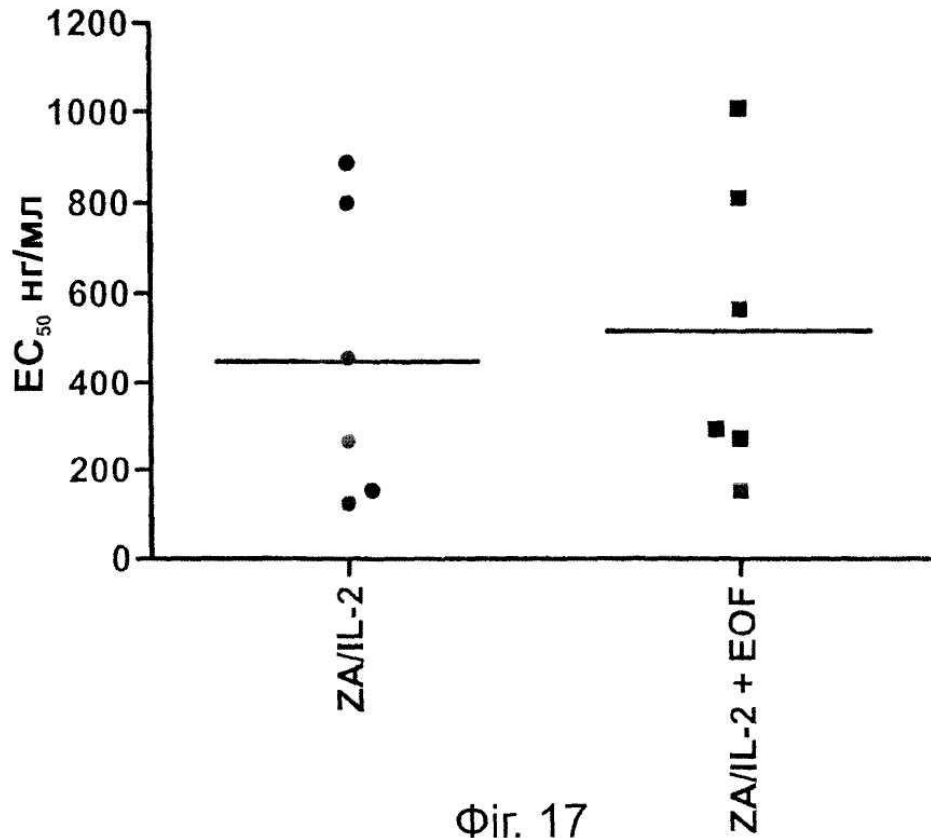
ФІГ. 15



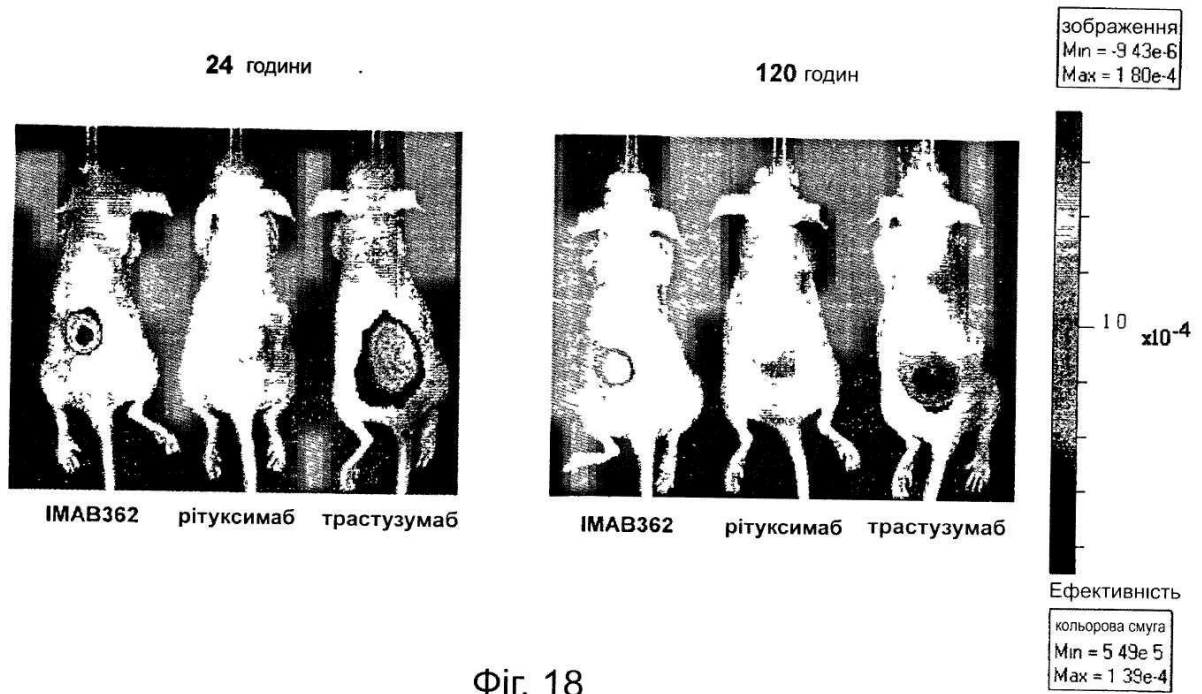
ФІГ. 15



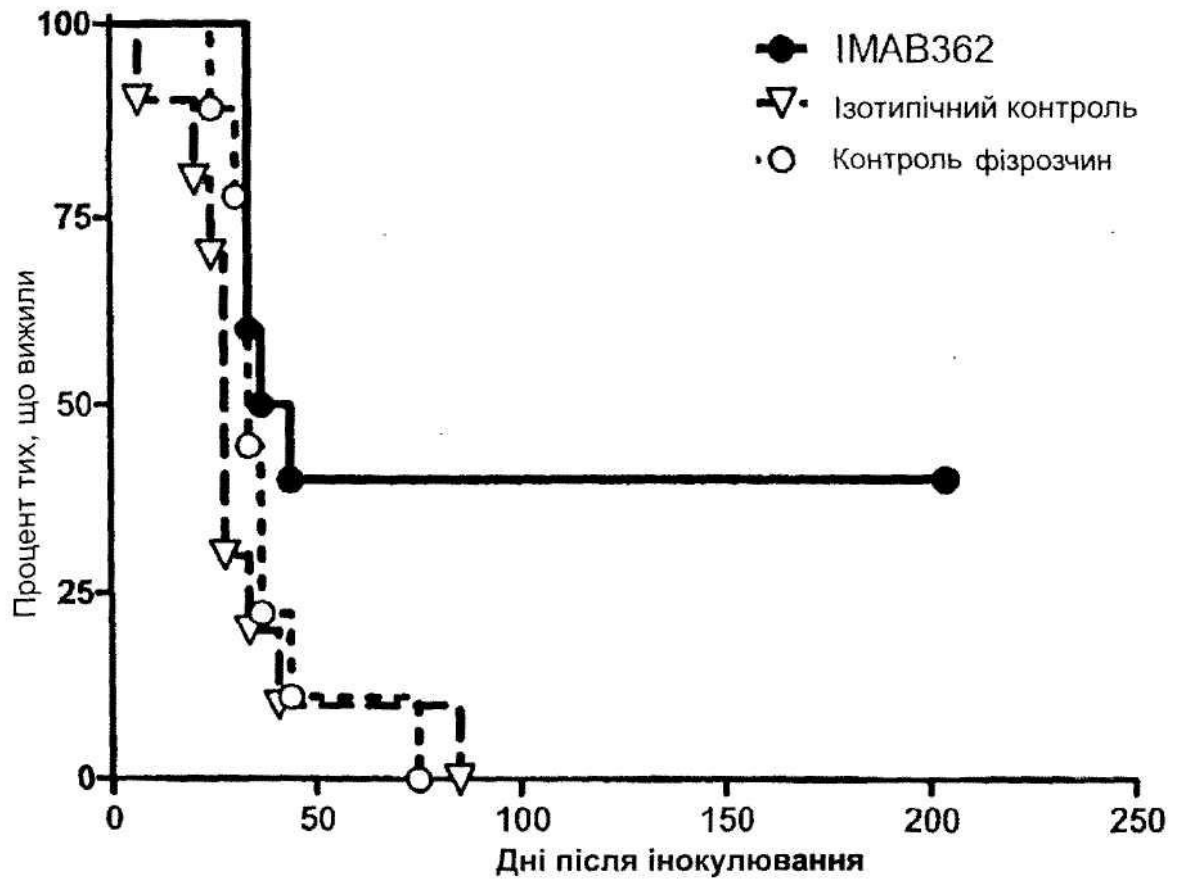
Фіг. 16



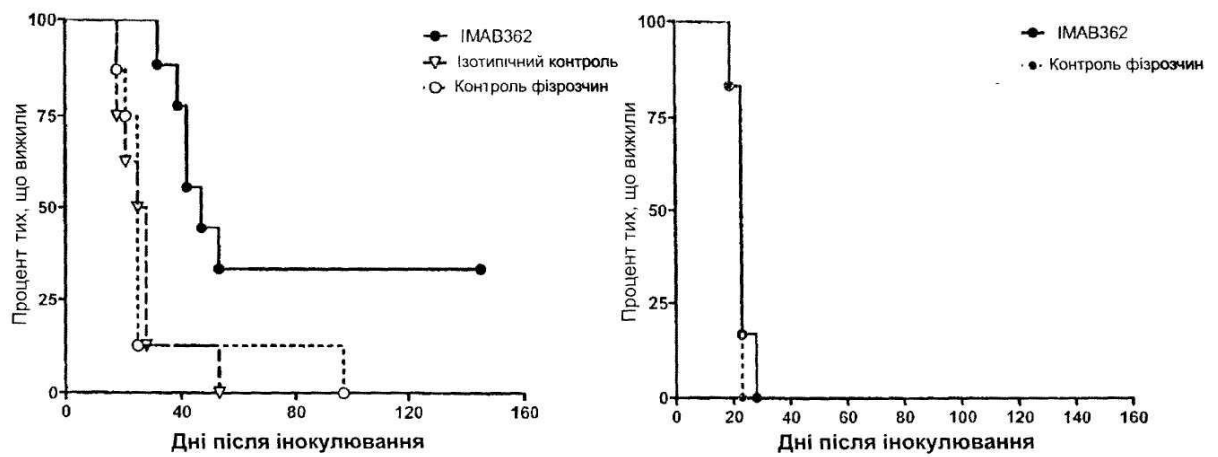
Фіг. 17



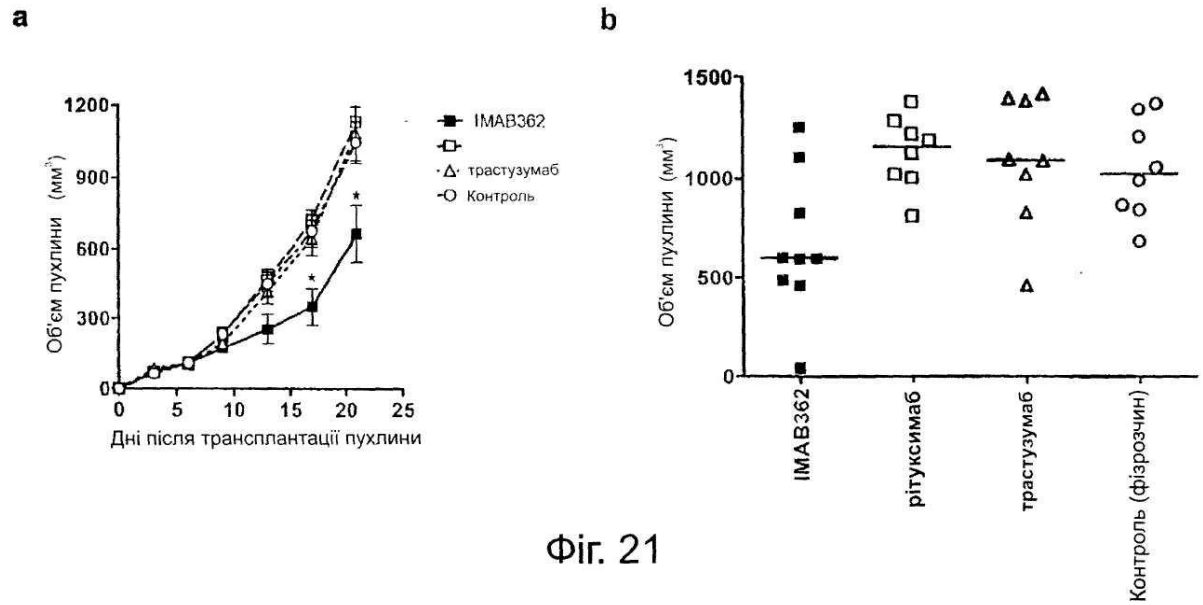
Фіг. 18



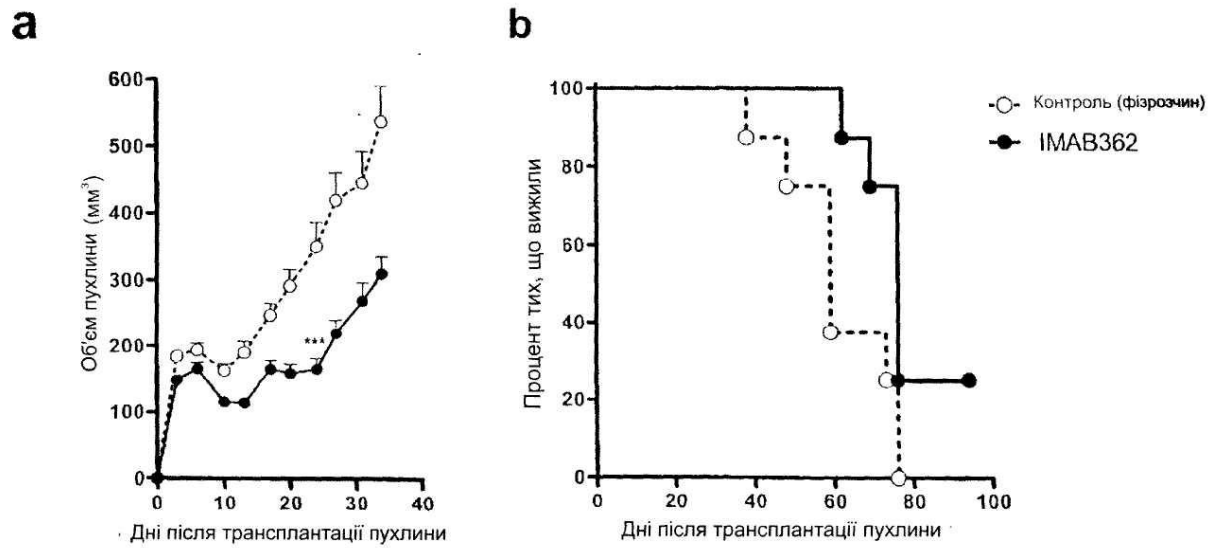
Фіг. 19



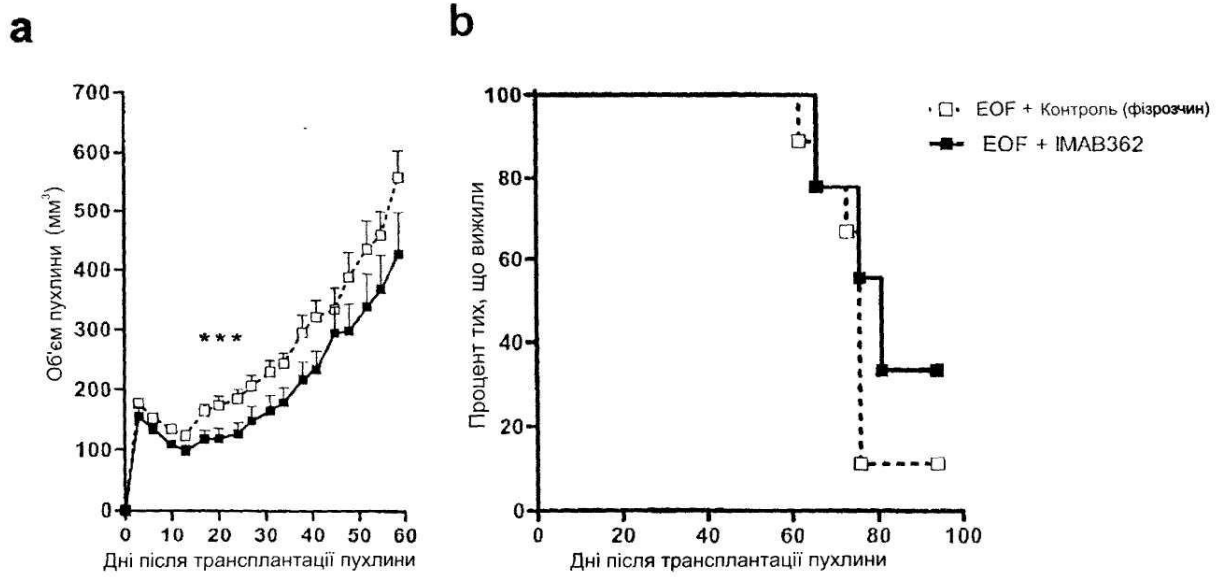
Фіг. 20



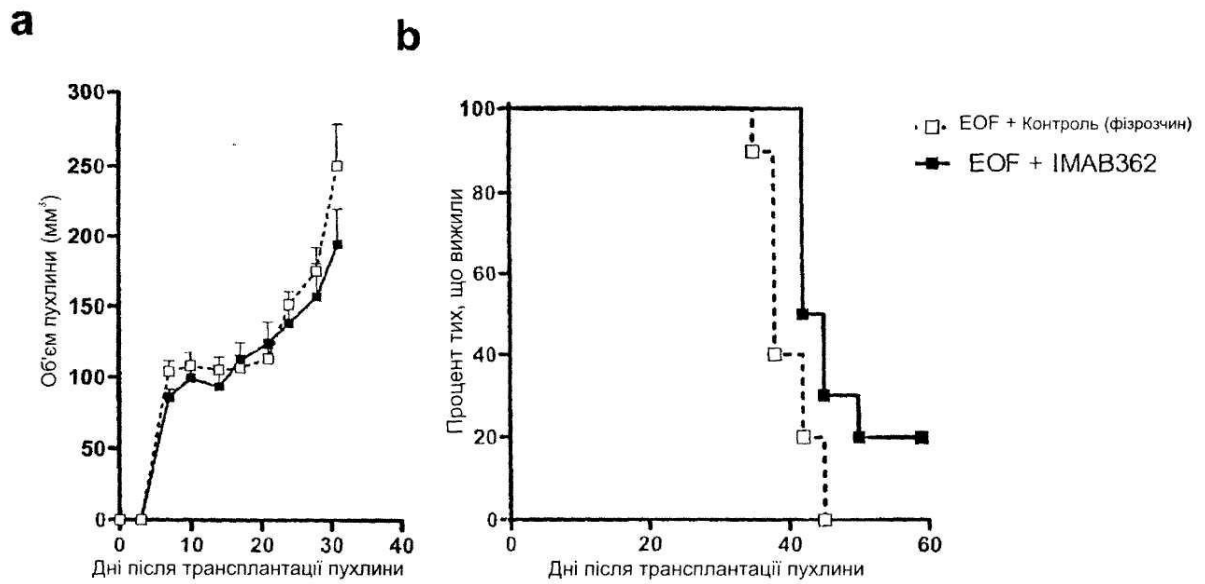
Фіг. 21



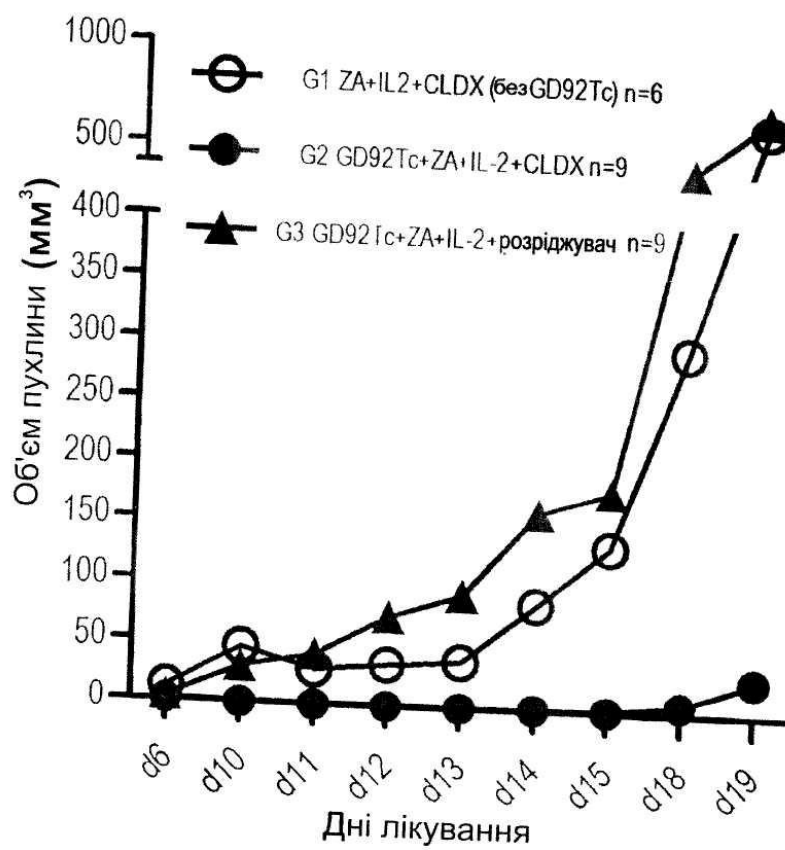
Фіг. 22



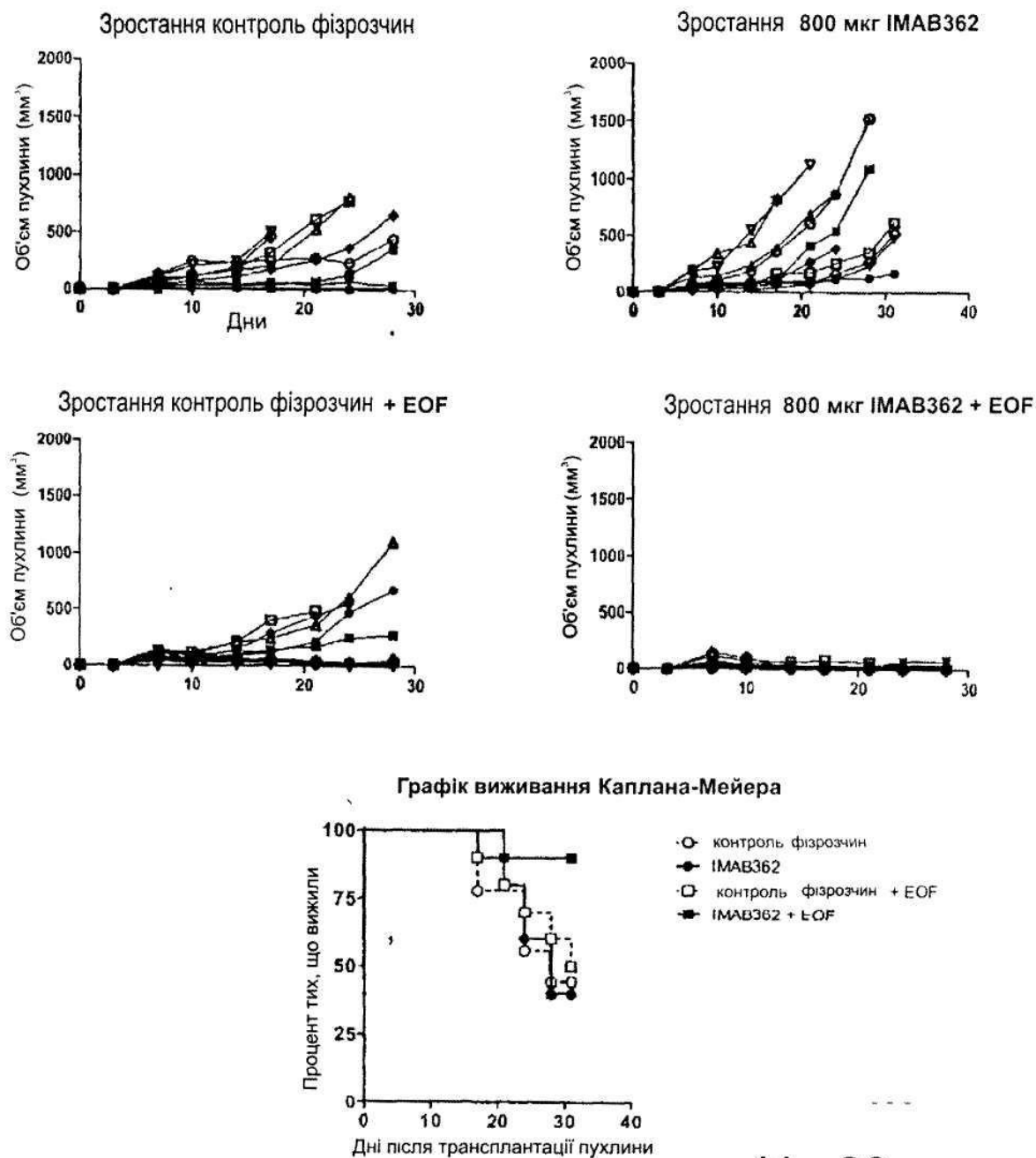
Фіг. 23



Фіг. 24



Фіг. 25



Фіг. 26

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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