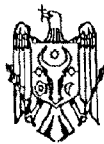




MD/EP 3283521 T2 2024.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3283521 (13) T2

(51) Int. Cl.:C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 16/30 (2006.01.01)
A61K 47/68 (2017.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61K 31/40 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0164 (22) Data de depozit: 2016.04.13 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16715583.7, 2016.04.13 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european:3283521, 2018.02.21 (31) Numărul cererii prioritare: PCT/EP2015/0582 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.04.15 (33) Țara cererii prioritare: WO	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2024, 2024.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 46/2023, 2023.11.15 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2018, 2018.04.30
(71) Solicitanți: ASTELLAS PHARMA INC., JP; TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ GEMEINNÜTZIGE GMBH, DE (72) Inventatori: SAHIN Ugur, DE; TÜRECI Özlem, DE; WALTER Korden, DE; KREUZBERG Maria, DE; MITNACHT-KRAUS Rita, DE; LE GALL Fabrice, DE; JACOBS Stefan, DE (73) Titular: ASTELLAS PHARMA INC., JP; TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ GEMEINNÜTZIGE GMBH, DE (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Conjugate de medicamente care conțin anticorpi împotriva claudinei 18.2

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție furnizează conjugăți anticorp anti-CLDN18.2-medicament care sunt eficienți pentru tratarea și/sau prevenirea bolilor canceroase asociate cu celulele care

2

exprimă CLDN18.2, inclusiv cancerul gastric, cancerul esofagian, cancerul pancreatic, cancerul pulmonar, cancerul ovarian, cancerul de colon, cancer hepatic, cancer cap-gât și

MD/EP 3283521 T2 2024.03.31

cancer al vezicii biliare și metastaze ale acestora, în special metastaza cancerului gastric cum ar fi tumori Krukenberg, metastază peritoneală și metastază în ganglioni limfatici. Bolile preferate în mod special sunt

adenocarcinoame la stomac, esofag, ductul pancreatic, ductele biliare, plămân și ovar.

Secvențe: 51

Revendicări: 12

Figuri: 26

(54) Drug conjugates comprising antibodies against CLAUDIN 18.2

(57) Abstract:

1

The present invention provides anti-CLDN18.2 antibody-drug conjugates which are effective for treating and/or preventing cancer diseases associated with cells expressing CLDN18.2, including gastric cancer, esophageal cancer, pancreatic cancer,

2

lung cancer, ovarian cancer, colon cancer, hepatic cancer, head-neck cancer, and cancer of the gallbladder and metastases thereof.

Sequences: 51

Claims: 12

Fig.: 26

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

Anticorpii monoclonali (mAB) au revoluționat tratamentul cancerului în ultimele două decenii (Sliwowski, M. X. et al. (2013) *Science* 341 (6151), 1192-1198). O caracteristică esențială a mAB este specificitatea mare și capacitatea lor de a ținti celulele tumorale, marcându-le pentru distrugere celulară mediată de efectori imuni (citotoxicitate dependentă de complement (CDC), citotoxicitate celulară dependentă de anticorp (ADCC)) și/sau ducând la proliferare redusă și apoptoză (Kubota, T. et al. (2009) *Cancer Sci.* 100 (9), 1566-1572). Conjugarea cu medicamente citotoxice poate extinde utilitatea mAB și le poate îmbunătăți potența și eficiența (Goldmacher, V. S. et al. (2011) *Ther. Deliv.* 2 (3), 397-416; Sievers, E. L. (2013) *Annu. Rev. Med.* 64, 15-29).

Din punct de vedere istoric, utilizarea medicamentelor citotoxice pentru tratamentul cancerului s-a centrat pe chimioterapii care ținesc celulele canceroase care se divid. Acești compuși nu ținesc doar celule canceroase, ci și alte celule sănătoase care se divid în corp, iar pacienții care primesc tratament manifestă efecte secundare severe care limitează doza. Indicele terapeutic (doza maximă tolerată/doza minimă eficientă) pentru aceste medicamente este mic, ducând la o fereastră terapeutică îngustă (Ismael, G. F. V. et al. (2008) *Cancer Treat Rev.* 34 (1), 81-91). Pentru a evita acest obstacol în dezvoltarea medicamentelor și îmbunătățirea indicelui terapeutic, anticorpii pot fi folosiți pentru a furniza medicamentul citotoxic specific în tumoare. Combinând capacitățile unice de țintire ale unui anticorp cu capacitatea de distrugere a cancerului a unui medicament citotoxic, conjugatii anticorp-medicament (ADC) prezintă efecte secundare mai mici și asigură o fereastră terapeutică mai largă comparativ cu agenții chimioterapeutici tradiționali (Gerber, H.-P. et al. (2013) *Nat. Prod. Rep.* 30 (5), 625-639).

ADC sunt proiectați să distrugă celulele canceroase într-un mod dependent de țintă. Prima etapă în acest proces este legarea anticorpului de antigenul său. La legarea ADC, întregul complex antigen-ADC este internalizat și încărcătura citotoxică este eliberată în celula tumorală, ducând la moartea celulelor. Factorii care influențează indicele terapeutic pentru ADC includ anticorpul, antigenul țintă tumoral, medicamentul citotoxic și linkerul (Panowski, S. et al. (2014) *MAbs* 6 (1), 34-45).

Ca o cerință de bază pentru dezvoltarea ADC, antigenul tumoral țintă trebuie localizat pe suprafața celulară și accesibil anticorpului circulant. În plus, selectivitatea tumorală și nivelul de expresie al antigenului țintă sunt parametri esențiali pentru proiectarea ADC siguri și eficienți. În prezent se evaluează o varietate de antigene de suprafață celulară asociate cu tumori ca ținte ADC pentru terapia anti-cancer (Trail, P. A. (2013) *Antibodies* 2 (1), 113-129; Teicher, B. A. (2009) *Curr. Cancer Drug Targets* 9 (8), 982-1004).

Eficiența unui ADC depinde și de medicamentul citotoxic. Cantitatea de anticorp care se localizează într-o tumoare fiind foarte mică în comparație cu doza administrată, sunt necesari compuși toxici cu potență sub-nanomolară. Auristatinele și maytansinoidele reprezintă două clase de citotoxine foarte potente folosite în prezent în dezvoltarea ADC (Trail, P. A. (2013) *Antibodies* 2 (1), 113-129). Ambele sunt agenți antimitotici care blochează polimerizarea tubulinei care provoacă moartea celulară printr-o oprire a ciclului celular în faza G2/M (Lopus, M. et al. (2010) *Mol. Cancer Ther.* 9 (10), 2689-2699; Francisco, J. A et al. (2003) *Blood* 102 (4), 1458-1465). Pe lângă specificitatea mAB și potența medicamentului, linkerul este un element important în dezvoltarea ADC. Linkerul ar trebui să fie stabil pentru a exploata timpul de înjumătățire farmacocinetic al mAB și nu ar trebui să elibereze medicamentul citotoxic până la internalizarea mediată de antigen. Linkerii pot fi clasificați în funcție de mecanismul de eliberare a medicamentului: linkerii clivabili eliberează medicamentul prin hidroliză sau clivare enzimatică după internalizarea specifică antigenului, în timp ce linkerii neclivabili eliberează medicamentul prin degradarea mAB în lizozomi după internalizare (Dosio, F. et al. (2011) *Toxins (Basel)* 3 (7), S. 848-883).

În funcție de proiectarea linkerului, toxinele permeabile prin membrană (lipofile) care sunt eliberate în celulele țintă pozitive pot trece prin membrana celulară și pot distruge alte celule din imediata apropiere, inclusiv celule canceroase învecinate cărora le lipsește expresia antigenului (efect martor) (Kovtun, Y. V. et al. (2006) *Cancer Res.* 66 (6), 3214-3221). Capacitatea acestor medicamente citotoxice de a media distrugerea martorilor locali este un criteriu de selecție important pentru ADC direcționați împotriva antigenelor exprimate eterogen în tumori.

Molecula de joncțiune strânsă claudina 18 izotip 2 (CLDN18.2) este o variantă de matisare asociată cu cancer a Claudin 18. CLDN18.2 este o proteină transmembranară de 27.8 kDa cuprinzând patru domenii care acoperă membrana cu două bucle extracelulare mici (buc1 cuprinsă de regiunea hidrofobă 1 și regiunea hidrofobă 2; buc2 cuprinsă de regiunile hidrofobe 3 și 4). CLDN18.2 este un antigen din linia gastrică foarte selectiv, exprimat exclusiv pe celule epiteliale gastrice diferențiate cu o

durată scurtă de viață și nedetectabil în orice alt țesut uman normal. Antigenul este exprimat ectopic la niveluri semnificative într-o diversitate de cancere umane inclusiv cancer gastroesofagian și pancreatic (Sahin, U., et al., Clin Cancer Res, 2008. 14(23): p. 7624-34). Proteina CLDN18.2 este de asemenea detectată frecvent în metastazele în ganglioni limfatici ale cancerului gastric și în metastaze distante.

CLDN18.2 pare să fie implicată în proliferarea celulelor tumorale pozitive la CLDN18.2, fiindcă reducerea țintei prin tehnologia siARN duce la inhibarea proliferării celulelor canceroase gastrice.

Documentul EP1997832 descrie prepararea anticorpilor care se leagă de CLDN18.2 și propune prepararea ADC.

IMAB362 este un anticorp monoclonal himeric de subtip IgG1 direcționat împotriva CLDN18.2. IMAB362 recunoaște primul domeniu extracelular al CLDN18.2 cu afinitate și specificitate ridicate și nu se leagă de nici un alt membru al familiei claudinelor, inclusiv varianta de matisare 1 strâns înrudită a Claudin 18. (CLDN18.1). În xenogrefele umane care exprimă CLDN18.2, s-au observat beneficiu de supraviețuire și regresii tumorale la șoareci după administrarea IMAB362. Când se administrează intravenos la speciile de animale relevante, nu se observă toxicitate în țesutul gastric, deoarece epitopul țintă nu este accesibil. Ținta tumorală devine însă accesibilă pentru IMAB362 în timpul transformării maligne. IMAB362 reunește patru mecanisme de acțiune independente foarte puternice: (i) citotoxicitate celulară dependentă de anticorp (ADCC), (ii) citotoxicitate dependentă de complement (CDC), (iii) inducerea apoptozei indusă de legarea încrucișată a țintei la suprafața tumorală și (iv) inhibarea directă a proliferării. Un studiu anterior faza I a evaluat IMAB362 ca o monoterapie într-o singură doză la pacienți cu cancer gastroesofagian în stadiu avansat. Acest studiu arată că o singură administrare a acestui anticorp este sigură și bine tolerată într-un dozaj de până la 1000 mg/m², nefiind observate diferențe relevante privind profilul AE și alți parametri de siguranță între grupurile de doze (AE = eveniment advers). Cele mai bune rezultate cu privire la activitatea antitumorală s-au obținut pentru grupurile cu 300 mg/m² și 600 mg/m². S-a efectuat un studiu clinic faza IIa pentru a determina siguranța, tolerabilitatea și activitatea antitumorală ale dozelor repetitive de IMAB362 la pacienți cu boală metastatică, refractară sau recurentă de adenocarcinom avansat la stomac sau esofagul inferior dovedit histologic.

După cum s-a descris mai sus, CLDN18.2 are un tipar de expresie restrâns în celule normale și, astfel, pare a fi o țintă ideală pentru terapia dirijată de anticorpi a cancerului care exprimă CLDN18.2. În consecință, este nevoie de o terapie orientată împotriva celulelor canceroase care exprimă CLDN18.2 care să fie capabilă să exercite un efect citotoxic sau citostatic util clinic asupra celulelor care exprimă CLDN18.2, în mod specific fără a exercita efecte nedorite asupra celulelor care nu exprimă CLDN18.2. De preferință, terapia nu ar trebui să fie asociată cu dezavantaje și efecte secundare nedorite asociate în mod obișnuit cu metodele utilizate pentru creșterea eficienței terapeutice a anticorpilor cum ar fi radiomarcare și combinația cu chimioterapie. De exemplu, terapia cu izotopi este asociată cu mielosupresie, iar terapia combinată cu anticorpi și agenți chimioterapeutici este asociată cu imunosupresie. În plus, substanțele marcate izotopic sunt dificil de produs, iar pacienții prezintă adesea recidive după tratamentul inițial cu substanțe marcate izotopic.

Prezenta invenție demonstrează existența anticorpilor monoclonali anti-CLDN18.2 care pot fi internalizați foarte eficient la legarea CLDN18.2 pe celule care exprimă CLDN18.2 și așadar sunt adecvați pentru dezvoltarea ADC. În plus, se divulgă conjugarea cu succes a acestor anticorpi cu medicamentele DM4 și MMAE folosind linkerii SPDB sau Val-Cit (vc) clivabili. *In vitro*, conjugății cu anticorpi reduc viabilitatea celulelor canceroase gastrice și pancreatice care exprimă CLDN18.2. IMAB362-vcMMAE și IMAB362-DM4 nu se leagă de celulele negative la CLDN18.2 sau nu le influențează viabilitatea. Ambii conjugăți DM4 și vcMMAE exercită efecte de distrugere a matorului pe celule canceroase CLDN18.2-negative co-cultivate cu celule canceroase CLDN18.2-pozitive *in vitro*. În plus, *in vivo*, administrarea intravenoasă a conjugăților de anticorpi la șoareci fără păr cu tumori de xenogrefă gastrice sau pancreatice CLDN18.2-pozitive duce la inhibarea dependentă de doză a creșterii tumorale, beneficiu de supraviețuire și chiar regresie completă a tumorilor incipiente și avansate. Se observă efecte terapeutice semnificative la aplicarea intravenoasă a dozelor individuale de ~4-8 mg/kg; se obțin efecte terapeutice optime la 15-16 mg/kg. Nu s-a putut determina doza individuală maximă tolerată a celor doi conjugăți fiindcă cele mai mari doze testate posibile de 15.2 și 16 mg/kg nu au produs toxicități hepatice sau alte efecte toxice.

Din datele prezentate aici se poate concluziona că acești conjugăți anticorp anti-CLDN18.2-medicament descriși în prezenta sunt medicamente foarte potente pentru tratamentul carcinoamelor umane CLDN18.2-pozitive precum carcinoame gastrice și pancreatice.

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție este definită de revendicările anexate.

Invenția se bazează pe specificația explicată în cele ce urmează:

REZUMAT

Prezenta specificație prevede în general o terapie pentru tratarea și/sau prevenirea eficiente ale cancerului asociat cu celule care exprimă CLDN18.2 cum ar fi cancer gastric, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer pulmonar cum ar fi cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer ovarian, cancer de colon, cancer hepatic, cancer la cap și gât, cancerul vezicii biliare și metastaze ale acestora, în special metastaza cancerului gastric cum ar fi tumori Krukenberg, metastază peritoneală și metastază în ganglioni limfatici. Bolile preferate în mod special sunt adenocarcinoame la stomac, esofag, ductul pancreatic, ductele biliare, plămân și ovar.

Într-un aspect, prezenta invenție prevede o metodă de tratare sau prevenire a unui cancer care exprimă CLDN18.2 cuprinzând administrarea unui conjugat anticorp-medicament care cuprinde un anticorp care se poate lega de CLDN18.2 atașată covalent de cel puțin o fracțiune medicamentoasă toxică la un pacient cu cancer.

Conjugatul anticorp-medicament este internalizat în celule după legare de CLDN18.2 exprimată de celule.

Anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă specific de CLDN18.2. Conjugatul anticorp-medicament se leagă specific de CLDN18.2.

Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este un anticorp monoclonal, himeric sau umanizat sau un fragment al unui anticorp. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este un anticorp monoclonal.

Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de epitopi naturali ai CLDN18.2 prezenți pe suprafața celulelor vii. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de un domeniu extracelular al CLDN18.2. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de prima buclă extracelulară a CLDN18.2.

Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este un anticorp selectat din grupul constând din (i) un anticorp produs de și/sau obținut dintr-o clonă depusă sub nr. de referință 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 sau DSM ACC2810, (ii) un anticorp reprezentând o formă himerizată sau umanizată a anticorpului de la (i), (iii) un anticorp având specificitatea anticorpului de la (i) și (iv) un anticorp cuprinzând porțiunea de legare a antigenului sau situsul de legare a antigenului, în special regiunea variabilă, a anticorpului de la (i) și de preferință având specificitatea anticorpului de la (i). Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 15 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 20. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște

același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 15 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 20 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Un anticorp care concurează cu un al doilea anticorp pentru legarea de o țintă este de preferință antagonist față de acel al doilea anticorp.

Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este permeabilă prin membrana celulară. Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este un agent citotoxic sau citostatic. Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este un maytansinoid sau o auristatină. Într-o aplicare, maytansinoidul este selectat din grupul constând din DM1 și DM4. Într-o aplicare, auristatina este selectată din grupul constând din monometil auristatina E (MMAE) și monometil auristatina F (MMAF).

Conform invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este atașat covalent de fracțiunea medicamentoasă toxică printr-un linker clivabil de o protează intracelulară. Într-o aplicare, linkerul este un linker clivabil de o catepsină. Într-o aplicare, linkerul cuprinde o dipeptidă. Într-o aplicare, dipeptida este val-cit sau phe-lys. Într-o aplicare, anticorpul este atașat de linker printr-un tiol din cisteina anticorpului. Într-o aplicare, anticorpul este atașat de linker prin grupe aminice, în mod specific grupe aminice ale reziduurilor de lizină ale anticorpului.

Într-o aplicare, conjugatul anticorp-medicament se administrează într-o cantitate eficientă pentru tratarea sau prevenirea cancerului care exprimă CLDN18.2. Într-o aplicare, conjugatul anticorp-medicament se administrează la o doză între 3 și 30 mg/kg greutate corporală, cum ar fi între 4 și 25, 5 și 20, 10 și 18 sau 15 și 16 mg/kg greutate corporală. Într-o aplicare, conjugatul anticorp-medicament se administrează la o doză între 8 și 150, 9 și 100 sau 9 și 90 mg/m² de suprafață corporală a unui pacient uman, cum ar fi între 12 și 75, 15 și 60, 30 și 54 sau 45 și 48 mg/m² de suprafață corporală a unui pacient uman. Într-o aplicare, se administrează o doză unică de conjugat anticorp-medicament sau două sau mai multe doze de conjugat anticorp-medicament. Într-o aplicare, conjugatul anticorp-medicament se administrează prin injecție intravenoasă.

Într-o aplicare, metoda din invenție cuprinde de asemenea administrarea terapiei chirurgicale, chimioterapiei și/sau radioterapiei.

Într-o aplicare, expresia CLDN18.2 este la suprafața celulelor canceroase. Într-o aplicare, cancerul este un adenocarcinom, în special un adenocarcinom avansat. Într-o aplicare, cancerul este selectat din grupul constând din cancer gastric, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer pulmonar cum ar fi cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer mamar, cancer ovarian, cancer de colon, cancer hepatic, cancer la cap și gât, cancer de vezică biliară și metastaza acestuia, o tumoare Krukenberg, metastază peritoneală și/sau metastază ganglionară limfatică. Într-o aplicare, cancerul este selectat din grupul constând din cancer stomacal, cancer esofagian, în special de esofag inferior, cancerul joncțiunii esogastrice și cancer gastro-esofagian. Într-o aplicare, pacientul este un pacient negativ la HER2/neu sau un pacient cu stare pozitivă la HER2/neu, dar care nu este eligibil la terapia cu trastuzumab.

Într-o aplicare, CLDN18.2 are secvența de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1.

Într-un alt aspect, prezenta invenție prevede un conjugat anticorp-medicament cuprinzând un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 atașat covalent de cel puțin o fracțiune medicamentoasă toxică.

Conjugatul anticorp-medicament este internalizat în celule în urma legării de CLDN18.2 exprimată de celule.

Anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă specific de CLDN18.2. Conjugatul anticorp-medicament se leagă specific de CLDN18.2.

Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este un anticorp monoclonal, himeric sau umanizat sau un fragment al unui anticorp. Într-o aplicare, anticorpul capabil să se lege de CLDN18.2 este un anticorp monoclonal.

Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de epitopi naturali ai CLDN18.2 prezenți pe suprafața celulelor vii. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de un domeniu extracelular al CLDN18.2. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de prima buclă extracelulară a CLDN18.2.

Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este un anticorp selectat din grupul constând din (i) un anticorp produs de și/sau obținut dintr-o clonă depusă sub nr. de referință 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 sau DSM ACC2810, (ii) un anticorp reprezentând o formă himerizată sau umanizată a anticorpului de la (i), (iii) un anticorp având specificitatea anticorpului de la (i) și (iv) un anticorp

cuprinzând porțiunea de legare a antigenului sau situsul de legare a antigenului, în mod specific regiunea variabilă, a anticorpului de la (i) și de preferință având specificitatea anticorpului de la (i). Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35. Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 15 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 20. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Într-un aspect al invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 recunoaște același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 15 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 20 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2. Un anticorp care concurează cu un al doilea anticorp pentru legarea de o țintă este de preferință antagonist față de acel al doilea anticorp.

Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este permeabilă prin membrana celulară. Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este un agent citotoxic sau citostatic. Într-o aplicare, fracțiunea medicamentoasă toxică este un maytansinoid sau o auristatină. Într-o aplicare, maytansinoidul este selectat din grupul constând din DM1 și DM4. Într-o aplicare, auristatina este selectată din grupul constând din monometil auristatina E (MMAE) și monometil auristatina F (MMAF).

Conform invenției, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este atașat covalent de fracțiunea medicamentoasă toxică printr-un linker clivabil de o protează intracelulară. Într-o aplicare, linkerul este un linker clivabil de o catepsină. Într-o aplicare, linkerul cuprinde o dipeptidă. Într-o aplicare, dipeptida este val-cit sau phe-lys. Într-o aplicare, anticorpul este atașat de linker printr-un tiol din cisteina anticorpului. Într-o aplicare, anticorpul este atașat de linker prin grupe aminice, în mod specific grupe aminice ale reziduurilor de lizină ale anticorpului.

Într-o aplicare, CLDN18.2 are secvența de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1.

Într-un alt aspect, prezenta invenție prevede o compoziție farmaceutică ce conține conjugatul anticorp-medicament din invenție și un solvent, vehicul sau excipient acceptabil farmaceutic.

Într-un alt aspect, prezenta invenție prevede un preparat medical cuprinzând conjugatul anticorp-medicament din invenție. Într-o aplicare, preparatul medical este prezent sub forma unui kit cuprinzând un recipient care include conjugatul anticorp-medicament. Într-o aplicare, preparatul medical mai include instrucțiuni imprimate de utilizare a preparatului într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului, în mod specific un cancer care exprimă CLDN18.2.

Într-un alt aspect, prezenta invenție prevede conjugatul anticorp-medicament din invenție, compoziția farmaceutică din invenție sau preparatul medical din invenție pentru utilizare terapeutică, în mod specific pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului, în mod specific un

cancer care exprimă CLDN18.2. Într-o aplicare, metoda de tratare sau prevenire a cancerului este o metodă de tratare a unui cancer care exprimă CLDN18.2 din invenție.

Alte caracteristici și avantaje ale prezentei invenții vor reieși din următoarea descriere detaliată și din revendicări.

5

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1: Conjugarea anticorpului cu medicamentul.

Figura 2: Reducerea viabilității după co-incubarea celulelor HEK293~CLDN18.2 cu mAb anti-CLDN18.2 himerici și Fab-ZAP (evaluare indirectă a internalizării).

10

Celulele HEK293~CLDN18.2 au fost incubate 72 h cu anticorpi specifici anti-CLDN18.2 și fragment Fab IgG anti-uman conjugat cu saporină (Fab-ZAP uman). Endocitoza IMAB362, chim mAB294, chim mAB308 și chim mAB359 s-a determinat indirect măsurând viabilitatea celulară. Punctele de date (n=3 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

15

Figura 3: Reducerea viabilității după co-incubarea celulelor HEK293~CLDN18.2 cu anticorpi anti-CLDN18.2 murini și Fab-ZAP (evaluare indirectă a internalizării).

Celulele HEK293~CLDN18.2 au fost incubate 72 h cu anticorpi murini reactivi anti-CLDN18.2 și fragment Fab IgG anti-șoarece conjugat cu saporină (Fab-ZAP murin). Endocitoza diferiților anticorpi murini reactivi anti-CLDN18.2 -a determinat indirect măsurând viabilitatea celulară.

20

Figura 4: Afinitățile de legare relative ale IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE de celule pozitive la CLDN18.2.

Afinitățile de legare relative ale conjugatilor IMAB362-toxină comparativ cu IMAB362 neconjugat s-au determinat pe celule (A) NUGC-4 10cF7-5 sort3a și (B) DAN-G 1C5F2 care exprimă endogen CLDN18.2, celule (C) NCI-N87~CLDN18.2 și (D) BxPC-3~CLDN18.2 care supraexprimă ectopic CLDN18.2 prin citometrie în flux la concentrații ale anticorpului de până la 20 μ g/ml. Punctele de date (n=2 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

25

Figura 5: Legarea mediată de CLDN18.2 a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE.

Legarea mediată de CLDN18.2 a conjugatilor IMAB362-toxină a fost analizată pe (A) celule NCI-N87~CLDN18.2 care supraexprimă ectopic CLDN18.2 și pe (B) linia celulară tumorală umană negativă la CLDN18.2 corespunzătoare prin citometrie în flux la concentrații ale anticorpului de până la 20 μ g/ml. Punctele de date (n=2 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

30

Figura 6: Specificitățile de legare ale IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE.

Specificitățile de legare ale conjugatilor IMAB362-toxină s-au determinat pe celule (A) HEK293~CLDN18.2, (B) HEK293~CLDN18.1 sau (C) HEK293~control ca un control negativ. Legarea a fost analizată prin citometrie în flux la concentrații ale anticorpului de până la 20 μ g/ml. Punctele de date (n=2 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

35

Figura 7: Efectul IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE asupra viabilității liniilor celulare de carcinom uman care exprimă CLDN18.2.

Curbele de răspuns la doză ale reducerii mediate de IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE a viabilității celulelor (A) NUGC-4 10cF7-5 sort 3a, (B) NCI-N87~CLDN18.2 și (C) BxPC-3~CLDN18.2. IMAB362 s-a folosit ca un control negativ (fără efect în testele de viabilitate în aceste condiții). Celulele au fost incubate 72 h în prezența anticorpului la concentrații de până la 16875 ng/ml. Reducerea viabilității celulare s-a măsurat folosind un test de viabilitate pe bază de XTT. Punctele de date (n=3 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

40

45

Figura 8: Dependența de CLDN18.2 a reducerii mediate de IMAB362-vcMMAE a viabilității celulelor tumorale.

Dependența de țintă a reducerii mediate de IMAB362-vcMMAE a viabilității celulare s-a determinat pe celule NCI-N87 (CLDN18.2-negative) și NCI-N87~CLDN18.2 care exprimă ectopic ținta. Celulele au fost incubate 72 h cu IMAB362-vcMMAE sau IMAB362 neconjugat la concentrații de până la 16875 ng/ml. Se știe că IMAB362 nu are activitate în condițiile experimentale folosite aici. Reducerea viabilității celulare s-a măsurat folosind un test de viabilitate pe bază de XTT. Punctele de date (n=3 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

50

Figura 9: Specificitatea reducerii mediate de IMAB362-vcMMAE a viabilității celulare.

Specificitatea la țintă a reducerii mediate de IMAB362-vcMMAE a viabilității celulare s-a testat cu celule HEK293~CLDN18.2 transfectate stabil, HEK293~CLDN18.1 și HEK293~control. Celulele au fost incubate 72 h în prezența IMAB362-vcMMAE la concentrații de până la 16875 ng/ml. Reducerea viabilității celulare s-a măsurat folosind un test de viabilitate pe bază de XTT. Punctele de date (n=3 reproducere) sunt indicate ca medie $\pm$ SD.

55

Figura 10: Activități martor ale IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE.

Inducerea mediată de IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE a efectelor martor s-au determinat în experimente de co-cultură folosind celule PA-1(Luc) (negative la CLDN18.2/pozitive la luciferază) și celule NUGC-4 10cE8 (pozitive la CLDN18.2/negative la luciferază). Ca un control de fond, celulele PA-1(Luc) s-au incubat cu IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Pentru tratament, celulele au fost cultivate 4 zile în prezența a 200 ng/ml IMAB362-DM4, 800 ng/ml IMAB362-vcMMAE sau 800 ng/ml IMAB362. S-a măsurat activitatea luciferazei.

Figura 11: Inhibarea creșterii tumorilor de xenogrefă BxPC-3~CLDN18.2 avansate de către IMAB362-DM4.

Celulele BxPC-3~CLDN18.2 CLDN18.2-pozitive au fost grefate subcutanat în partea laterală a șoarecilor fără păr atimici femele. În ziua 14, șoarecii au fost organizați în 4 grupuri și injectați intravenos cu o singură doză de vehicul, 7.5 mg/kg, 15 mg/kg IMAB362-DM4 sau o doză repetată de 15 mg/kg IMAB362-DM4 (ziua 14 și 21). Dimensiunea tumorilor subcutanate s-a măsurat de două ori pe săptămână (medie + SEM). Mărime grup n=5. SD: doză unică, RD: doză repetată.

Figura 12: Greutatea corporală medie a șoarecilor tratați cu IMAB362-DM4.

Greutatea corporală a șoarecilor fără păr purtători de tumori BxPC-3~CLDN18.2 tratați cu o doză unică de control vehicul, 7.5 mg/kg sau 15 mg/kg sau doze repetate de 15 mg/kg IMAB362-DM4 s-a monitorizat de două ori pe săptămână. Greutatea corporală a celor 4 grupuri este prezentată ca medie. Mărime grup n=5.

Figura 13: Parametrii chimici clinici din administrarea dozelor unice și repetate de IMAB362-DM4 în șoareci fără păr cu xenogrefe.

Analiza chimică clinică a șoarecilor fără păr femele purtători de tumori BxPC-3~CLDN18.2 tratați intravenos cu o doză unică de vehicul, 7.5 mg/kg, 15 mg/kg IMAB362-DM4 sau o doză repetată de 15 mg/kg IMAB362-DM4 s-a efectuat în ziua 49 după grefare. A) Alanin transaminaza (GPT), B) aspartat transaminaza (GOT), C) glutamat dehidrogenaza, D) fosfataza alcalină, E) α -amilaza, F) colinesteraza, G) creatin kinaza (CK), H) lactat dehidrogenaza (LDH), I) lipază, J) uree, K) glucoză, L) proteină totală și M) albumină.

Figura 14: Analiza histologică a secțiunilor de stomac de la șoareci tratați cu IMAB362-DM4 și vehicul.

Șoarecii purtători de tumori de xenogrefă BxPC-3~CLDN18.2 au fost tratați cu IMAB362-DM4. În ziua 49 șoarecii post-grefă au fost sacrificați și organele selectate au fost disecate și fixate în formalină. Secțiuni din aceste țesuturi FFPE s-au colorat cu hematoxilin-eozină și s-au examinat microscopic cu privire la modificări morfologice. (A, C) Țesuturi stomacale ale unui șoarece reprezentativ din grupul de tratament cu cea mai mare expunere IMAB362-DM4 (15 mg/kg IMAB362-DM4 în ziua 14 și ziua 21 post-grefă). (B, D) Țesuturi stomacale ale unui șoarece din grupul de control tratat doar cu vehicul. Mărime: vezi bara de scară.

Figura 15: Inhibarea creșterii tumorilor de xenogrefă BxPC-3~CLDN18.2 avansate de către IMAB362-vcMMAE.

Celulele BxPC-3~CLDN18.2 CLDN18.2-pozitive au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 14, șoarecii au fost organizați în 4 grupuri și injectați intravenos cu o singură doză de vehicul, 8 mg/kg, 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau o doză repetată de 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE (ziua 14 și 21). Dimensiunea tumorilor subcutanate s-a măsurat de două ori pe săptămână (medie + SEM). Mărime grup n=5.

Figura 16: Greutatea corporală medie a șoarecilor tratați cu IMAB362-vcMMAE.

Greutatea corporală a șoarecilor fără păr femele purtători de tumori tratați cu o doză unică de control vehicul, 8 mg/kg sau 16 mg/kg sau doze repetate de 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE s-a monitorizat de două ori pe săptămână. Greutatea corporală a celor 4 grupuri este prezentată ca medie. Mărime grup n=5.

Figura 17: Parametrii chimici clinici din administrarea dozelor unice și repetate de IMAB362-vcMMAE în șoareci fără păr cu xenogrefe.

Analiza chimică clinică a șoarecilor fără păr femele purtători de tumori BxPC-3~CLDN18.2 tratați intravenos cu o doză unică de vehicul, 8 mg/kg, 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau o doză repetată de 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE s-a efectuat în ziua 37 după grefare. A) Alanin transaminaza (GPT), B) aspartat transaminaza (GOT), C) glutamat dehidrogenaza, D) fosfataza alcalină, E) α -amilaza, F) colinesteraza, G) creatin kinaza (CK), H) lactat dehidrogenaza (LDH), I) lipază, J) uree, K) glucoză, L) proteină totală și M) albumină.

Figura 18: Eficiența anti-tumorală dependentă de doză a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE într-un model tumoral de xenogrefă gastric NCI-N87~CLDN18.2 uman avansat.

Celulele NCI-N87~CLDN18.2 care exprimă ectopic CLDN18.2 umană au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 10 post grefare, șoarecii au fost grupați și injectați intravenos cu o singură doză de vehicul, 3.8, 7.6 sau 15.2 mg/kg IMAB362-DM4 sau 4, 8 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE în

ziua 13. Un alt grup de control a primit doze repetate de ~8 mg/kg IMAB362 de două ori pe săptămână alternând injecții IV și i.p.. Volumele tumorale s-au măsurat de două ori pe săptămână. Animalele au fost sacrificate când volumul tumoral a depășit 1400 mm³ sau când tumorile au ulcerat. Analiza statistică a creșterii tumorale s-a efectuat folosind Kruskal-Wallis și test post-hoc Dunn. Supraviețuirea s-a analizat folosind testul Mantel Cox care compară grupul de control vehicul cu IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE. (A-H) Curbe de creștere tumorală, (I, K) creștere tumorală medie ($\pm$ SEM) și (J, L) grafice de supraviețuire a șoarecilor tratați cu control vehicul, IMAB362 sau IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Mărime grup: n=11; *: p<0.05; ***p<0.001. Săgeata indică începutul tratamentului.

Figura 19: Eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE într-un model tumoral de xenogrefă gastric NUGC-4 10cF7-5 sort3a uman incipient.

Celulele NUGC-4 10cF7-5 sort3a care exprimă endogen CLDN18.2 au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 3, șoarecii au primit vehicul, 15.2 mg/kg IMAB362-DM4 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE printr-o singură injecție IV. Volumele tumorale s-au măsurat de două ori pe săptămână. Animalele au fost sacrificate când volumul tumoral a depășit 1400 mm³ sau când tumorile au ulcerat sau după perioada de observare predefinită de 120 de zile. Analiza statistică a creșterii tumorale s-a efectuat folosind Kruskal-Wallis și test post-hoc Dunn. Supraviețuirea s-a analizat folosind testul Mantel Cox. (A-C) Curbe de creștere tumorală, (D) creștere tumorală medie ($\pm$ SEM) și (E, F) grafice de supraviețuire a șoarecilor tratați cu control vehicul, IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Mărime grup: n=10; ***: p<0.001; ****: p<0.0001. Săgeata indică punctul în timp al tratamentului.

Figura 20: Eficiența anti-tumorală dependentă de doză a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE într-un model tumoral de xenogrefă pancreatic BxPC-3~CLDN18.2 uman avansat.

Celulele BxPC-3~CLDN18.2 care exprimă ectopic CLDN18.2 umană au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 13, șoarecii au fost grupați și injectați intravenos cu o singură doză de vehicul, 3.8, 7.6 sau 15.2 mg/kg IMAB362-DM4 sau 4, 8 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE în ziua 14. Șoarecii din grupul cu anticorp de control au primit ~8 mg/kg IMAB362 neconjugat de două ori pe săptămână alternând injecții IV și i.p.. Dimensiunea tumorală s-a măsurat de două ori pe săptămână. Animalele au fost sacrificate când volumul tumoral a depășit 1400 mm³ sau când tumorile au ulcerat. Analiza statistică a creșterii tumorale s-a efectuat folosind Kruskal-Wallis și test post-hoc Dunn. Supraviețuirea a fost analizată folosind testul Mantel Cox care compară grupul de control vehicul cu IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE. (A-H) Curbe de creștere tumorală (I, K) creștere tumorală medie ($\pm$ SEM) și (J, L) grafice de supraviețuire a șoarecilor tratați cu control vehicul, IMAB362, IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Mărime grup: n=11; p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; ****: p<0.0001. Săgeata indică punctul în timp al tratamentului.

Figura 21: Eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE într-un model tumoral de xenogrefă pancreatic DAN-G 1C5F2 uman incipient.

Celulele DAN-G 1C5F2 care exprimă endogen CLDN18.2 au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 3 post-grefare, șoarecii au fost tratați cu o singură injecție IV de control vehicul, 15.2 mg/kg IMAB362-DM4 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE. Volumele tumorale s-au măsurat de două ori pe săptămână. Animalele au fost sacrificate când șoarecii au pierdut peste 10% greutate corporală din cauza cașexiei provocate de cancer, când tumorile au ulcerat sau după perioada de observare predefinită de 120 de zile. Analiza statistică a creșterii tumorale s-a efectuat folosind Kruskal-Wallis și test post-hoc Dunn. Supraviețuirea s-a analizat folosind testul Mantel Cox. (A-C) Curbe de creștere tumorală (D) creștere tumorală medie ($\pm$ SEM) și (E, F) grafice de supraviețuire a șoarecilor tratați cu control vehicul, IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Mărime grup: n=10; **: p<0.01; ***: p<0.001. Săgeata indică punctul în timp al tratamentului.

Figura 22: Analiza histologică a secțiunilor de stomac de la șoareci tratați cu IMAB362-vcMMAE și vehicul.

Șoarecii purtători de tumori de xenogrefă BxPC-3~CLDN18.2 au fost tratați cu IMAB362-vcMMAE. În ziua 37 post-grefă șoarecii au fost sacrificați și organele selectate au fost disecate și fixate în formalină. Secțiuni din aceste țesuturi FFPE au fost colorate cu hematoxin-eozină și examinate microscopic cu privire la modificări morfologice. (A, C) Țesut stomacal al unui șoarece reprezentativ din grupul de tratament cu cea mai mare expunere IMAB362-vcMMAE (16 mg/kg IMAB362-vcMMAE în ziua 14 și ziua 21 post-grefă). (B, D) Țesut stomacal al unui șoarece din grupul de control tratat doar cu vehicul. Mărime: vezi bara de scară.

Figura 23: Inducerea apoptozei de către IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE.

Inducerea mediată de IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE a apoptozei s-a determinat măsurând activitatea caspazei 3/7 și prin colorare cu anexină V folosind celule NUGC-4 10cE8 pozitive țintă. A) Activitatea caspazei 3/7 s-a analizat după ce celulele au fost incubate 3 zile în prezența a 2.5 μ g/ml

anticorpi IMAB362 (n=3 reproduceri, medie $\pm$ SD). B) Analiza citometrică în flux a celulelor colorate cu anexină V și iodură de propidiu (PI) s-a efectuat la 4 zile după tratament cu 2.5 μ g/ml anticorpi IMAB362 (n=3 reproduceri). Celulele netratate au avut rol de control.

Figura 24: Eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE într-un model tumoral de xenogrefă gastric NUGC-4 10cF7-5 sort3a uman avansat.

Celulele NUGC-4 10cF7-5 sort3a care exprimă endogen CLDN18.2 au fost grefate subcutanat în șoareci fără păr femele. În ziua 10, șoarecii au primit vehicul, 15.2 mg/kg IMAB362-DM4 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE printr-o singură injecție IV. Volumele tumorale s-au măsurat de două ori pe săptămână. Animalele au fost sacrificate când volumul tumoral a depășit 1400 mm³, când tumorile au ulcerat sau după perioada de observare predefinită de 120 de zile. Analiza statistică a creșterii tumorale s-a efectuat folosind Kruskal-Wallis și test post-hoc Dunn. Supraviețuirea s-a analizat folosind testul Mantel Cox. (A-C) Curbe de creștere tumorală, (D) creștere tumorală medie ($\pm$ SEM) și (E, F) grafice de supraviețuire a șoarecilor tratați cu control vehicul, IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Mărime grup: n=10; *: p<0.05; ***: p<0.001. Săgeata indică punctul în timp al tratamentului.

Figura 25: IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au mediat ADCC asupra celulelor canceroase umane care exprimă CLDN18.2.

A) Curbe de răspuns la doză ale ADCC mediate de IMAB362-DM4 (cercuri negre pline), IMAB362-vcMMAE (triunghiuri negre pline) și IMAB362 (pătrate negre deschise) asupra celulelor de carcinom stomacal uman NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 care exprimă endogen CLDN18.2. Experimentele s-au efectuat folosind un raport efector - țintă de -40:1. Punctele de date (n=4 reproduceri) sunt indicate ca medie $\pm$ SD. B) Analiza citometrică în flux a expresiei CLDN18.2 pe celule NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10. Histogramă umplută cu gri: anti-CLDN18.2 (IMAB362, 50 μ g/ml). Linie punctată neagră: control izotip.

Figura 26: IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au mediat CDC asupra celulelor canceroase umane care exprimă CLDN18.2.

A) Curbe de răspuns la doză ale CDC mediate de IMAB362-DM4 (cercuri negre pline), IMAB362-vcMMAE (triunghiuri negre pline) și IMAB362 (pătrate negre deschise) asupra celulelor de carcinom stomacal uman KATO-III FGF BP#12 adM p3151#25 (stânga) și NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 (dreapta) care exprimă endogen CLDN18.2. Celulele țintă care exprimă luciferaza au fost incubate 90 min cu 20% ser uman (de la donatori umani sănătoși) și anticorpii respectivi la concentrațiile indicate. Punctele de date (n=3 reproduceri) sunt indicate ca medie $\pm$ SD. B) Analize citometrice în flux ale expresiei CLDN18.2 pe celule KATO-III FGF BP#12 adM p3151#25 (stânga) și NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 (dreapta). Histogramă umplută cu gri: anti-CLDN18.2 (IMAB362, 50 μ g/ml). Linie punctată neagră: control izotip.

DESCRIERE DETALIATĂ

Invenția este definită în revendicări.

Deși prezenta specificație este descrisă detaliat mai jos, se va înțelege că această descriere nu se limitează la anumite metodologii, proceduri și reactivi descriși în prezenta, care pot varia. Se va înțelege de asemenea că terminologia folosită în prezenta are exclusiv scopul de a descrie anumite aplicări, fără a limita sfera de aplicare a prezentei invenții, care va fi limitată doar de revendicările anexate. Dacă nu se definesc în alt mod, toți termenii tehnici și științifici folosiți în prezenta au înțelesul folosit în mod uzual în domeniu.

În cele ce urmează se vor descrie elementele prezentei invenții. Aceste elemente sunt încadrate în aplicări specifice, însă se va înțelege că acestea pot fi combinate în orice manieră și în orice număr pentru a crea aplicări suplimentare. Diferitele exemple descrise și aplicările preferate nu vor fi interpretate ca o limitare a prezentei specificații doar la aplicările descrise în mod explicit. Această descriere va fi înțeleasă ca susținând și cuprinzând aplicări care combină aplicările descrise în mod explicit cu orice număr de elemente divulgate și/sau preferate. De asemenea, orice permutații și combinații ale tuturor elementelor descrise în prezenta cerere vor fi considerate divulgate de descrierea prezentei cereri, dacă nu se indică altceva în context.

De preferință, termenii utilizați în prezenta sunt definiți conform descrierii din "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel & H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Elveția (1995).

Punerea în practică a prezentei invenții va folosi, dacă nu se indică altceva, metodele convenționale din chimie, biochimie, biologie celulară, imunologie și tehnici ADN recombinant, explicate în literatura din domeniu (cf., de ex., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. 2, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

În cadrul prezentei specificații și al revendicărilor care urmează, dacă nu se indică altceva în context, termenul "cuprinde" și variațiile precum "cuprind" și "cuprinzând" se vor înțelege ca incluzând

un membru, un număr întreg sau o etapă sau un grup de membri, numere întregi sau etape menționat, dar fără a exclude orice alt membru, număr întreg sau etapă sau un grup de membri, numere întregi sau etape, deși în unele aplicări orice alt astfel de membru, număr întreg sau etapă sau grup de membri, numere întregi sau etape poate fi exclus, adică obiectul constă din includerea unui membru, unui număr întreg sau unei etape sau unui grup de membri, numere întregi sau etape menționat. Termenii "un" și "o" și referințele similare folosite în contextul descrierii invenției (în special în contextul revendicărilor) vor fi interpretați ca acoperind atât singularul, cât și pluralul, dacă nu se indică altceva în prezenta sau nu se menționează altceva în mod expres în context. Indicarea intervalelor de valori în prezenta constituie doar o modalitate concisă de a face referire individuală la fiecare valoare separată din intervalul respectiv. Dacă nu se indică altceva în prezenta, fiecare valoare individuală este încorporată în specificație ca și când ar fi menționată în mod individual în prezenta. Toate metodele descrise în prezenta pot fi efectuate în orice ordine corespunzătoare dacă nu se indică altceva în prezenta sau dacă nu se menționează altceva în mod expres în context. Folosirea oricăruia dintre exemple sau a limbajului exemplificativ (de ex., "cum ar fi") în prezenta are exclusiv scopul de a ilustra mai bine invenția și nu limitează în nici un fel sfera de aplicare a invenției revendicate. Nici un limbaj din specificație nu va fi interpretat ca indicând un element nerevendicat ca fiind esențial în aplicarea invenției.

Claudinele reprezintă o familie de proteine care sunt cele mai importante componente ale joncțiunilor strânse, unde stabilesc bariera paracelulară care controlează fluxul moleculelor în spațiul intercelular dintre celulele unui epitelii. Claudinele sunt proteine transmembranare care acoperă membrana de 4 ori cu extremitățile N și C situate ambele în citoplasmă. Prima buclă extracelulară, sau domeniu, constă în medie din 53 de aminoacizi, iar a doua buclă extracelulară, sau domeniu, constă din aproximativ 24 de aminoacizi. Proteinele de pe suprafața celulară din familia claudinelor, cum ar fi CLDN18.2, sunt exprimate în tumori de origini diferite și sunt adecvate în mod special ca structuri țintă în legătură cu imunoterapia cancerului mediată de anticorpi datorită expresiei lor selective (fără expresie într-un țesut normal relevant pentru toxicitate) și localizării în membrana plasmatică.

Termenul "CLDN", în sensul folosit în prezenta, înseamnă claudină și include CLDN18.2. De preferință, o claudină este o claudină umană.

Termenul "CLDN18" se referă la claudina 18 și include orice variante, inclusiv varianta de matisare 1 a claudinei 18 (claudin 18.1 (CLDN18.1)) și varianta de matisare 2 a claudinei 18 (claudin 18.2 (CLDN18.2)).

Termenul "CLDN18.2" se referă de preferință la CLDN18.2 umană și, în mod specific, la o proteină cuprinzând, de preferință constând din secvența de aminoacizi conform SEQ ID NO: 1 din lista secvențelor sau o variantă a secvenței aminoacidice respective. Prima buclă extracelulară, sau domeniu, a CLDN18.2 cuprinde de preferință aminoacizii 27 până la 81, mai preferabil aminoacizii 29 până la 78 din secvența de aminoacizi indicată în SEQ ID NO: 1. A doua buclă extracelulară, sau domeniu, a CLDN18.2 cuprinde de preferință aminoacizii 140 până la 180 din secvența de aminoacizi indicată în SEQ ID NO: 1. Prima și a doua buclă extracelulară formează de preferință porțiunea sau domeniul extracelular al CLDN18.2.

CLDN18.2 este exprimată selectiv în țesuturi normale în celule epiteliale diferențiate ale mucoasei gastrice. CLDN18.2 este exprimată în cancere de diferite origini cum ar fi carcinom pancreatic, carcinom esofagian, carcinom gastric, carcinom bronșic, carcinom mamar și tumori ENT. CLDN18.2 este o țintă importantă pentru prevenirea și/sau tratarea tumorilor primare, cum ar fi cancer gastric, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer pulmonar cum ar fi cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer ovarian, cancer de colon, cancer hepatic, cancer la cap și gât și cancere de vezică biliară și metastazele lor, în mod specific metastaza cancerului gastric cum ar fi tumori Krukenberg, metastază peritoneală și metastază ganglionară.

Termenul "CLDN18.1" se referă de preferință la CLDN18.1 umană și, în mod specific, la o proteină cuprinzând, de preferință constând din secvența de aminoacizi conform SEQ ID NO: 2 din lista de secvențe sau o variantă a secvenței aminoacidice respective.

Termenul "variantă" se referă conform invenției, în mod specific, la mutații, variante de matisare, conformațiuni, izoforme, variante alelice, variante de specie și omologi de specie, în special cele care apar în mod natural. O variantă alelică se referă la o modificare a secvenței normale a unei gene, a cărei importanță este adesea neclară. Secvențierea genică completă identifică adesea numeroase variante alelice ale unei gene date. Un omolog de specie este o secvență de acid nucleic sau secvență de aminoacizi cu o specie de origine diferită de cea a unei secvențe date de acid nucleic sau aminoacizi. Termenul "variantă" va include toate variantele modificate post-translațional și variante structurale.

Conform invenției, termenul "cancer care exprimă CLDN18.2" sau "cancer CLDN18.2-pozitiv" înseamnă un cancer care implică celule canceroase care exprimă CLDN18.2, de preferință pe suprafața celulelor canceroase respective.

"Suprafața celulară" se utilizează cu sensul său normal în domeniu, incluzând așadar exteriorul celulei care este accesibil legării de proteine și alte molecule.

CLDN18.2 este exprimată pe suprafața celulelor dacă se află la suprafața celulelor respective și este accesibilă legării de către anticorpi CLDN18.2-specifici adăugați în celule.

Termenul "porțiune extracelulară" sau "domeniu extracelular", în contextul prezentei invenții, se referă la o parte a unei molecule cum ar fi o proteină orientată către spațiul extracelular al unei celule și de preferință este accesibilă de la exteriorul celulei respective, de ex., de către molecule de legare a antigenului, cum ar fi anticorpi situați în afara celulei. De preferință, termenul se referă la una sau mai multe bucle sau domenii extracelulare sau un fragment al acestora.

Conform invenției, CLDN18.2 nu este în mare măsură exprimată într-o celulă dacă nivelul expresiei este mai scăzut comparativ cu expresia din celulele stomacale sau țesutul stomacal. De preferință, nivelul de expresie este mai mic decât 10%, de preferință mai mic decât 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% sau 0.05% din expresia din celulele stomacale sau țesutul stomacal sau chiar mai mic. De preferință, CLDN18.2 nu este în mare măsură exprimată într-o celulă dacă nivelul expresiei depășește nivelul expresiei din țesut necanceros, altul decât cel stomacal, cu nu mai mult decât de 2 ori, de preferință de 1,5 ori, și de preferință nu depășește nivelul expresiei din țesutul necanceros respectiv. De preferință, CLDN18.2 nu este în mare măsură exprimată într-o celulă dacă nivelul expresiei este sub limita de detecție și/sau dacă nivelul expresiei este prea mic pentru a permite legarea de către anticorpi CLDN18.2-specifici adăugați în celule.

Conform invenției, CLDN18.2 este exprimată într-o celulă dacă nivelul expresiei depășește nivelul expresiei în țesut necanceros, altul decât cel stomacal, cu nu mai mult decât de 2 ori, de preferință de 10 ori, de 100 de ori, de 1000 de ori sau de 10000 de ori. De preferință, CLDN18.2 este exprimată într-o celulă dacă nivelul expresiei este peste limita de detecție și/sau dacă nivelul expresiei este suficient de mare pentru a permite legarea de către anticorpi CLDN18.2-specifici adăugați în celule. De preferință, CLDN18.2 exprimată într-o celulă este exprimată sau expusă pe suprafața celulei respective.

Termenul "boală" se referă la o stare anormală care afectează corpul unui individ. O boală se înțelege adesea ca o afecțiune medicală asociată cu simptome și semne specifice. O boală poate fi cauzată de factori proveniți dintr-o sursă externă, cum ar fi o boală infecțioasă, sau poate fi cauzată de disfuncții interne, cum ar fi boli autoimune. La om, "boala" se utilizează adesea mai larg, desemnând orice afecțiune care cauzează durere, disfuncție, suferință, probleme sociale sau decesul individului afectat sau probleme similare celor în contact cu individul. În acest sens mai larg, include uneori leziuni, dizabilități, tulburări, sindroame, infecții, simptome izolate, compartamente deviante și variații atipice de structură și funcție, în timp ce în alte contexte și în alte scopuri acestea pot fi considerate categorii distincte. Bolile afectează de obicei indivizii nu doar fizic, ci și emoțional, deoarece contractarea și traiul cu mai multe boli poate schimba perspectiva asupra vieții și personalitatea. Conform invenției, termenul "boală" include cancer, în mod specific formele de cancer descrise în prezenta. Orice referință în prezenta la cancer sau forme specifice ale acestuia include și metastaza acestora. Într-o aplicare preferată, o boală tratabilă conform prezentei cereri implică celule care exprimă CLDN18.2.

"Boala care implică celule care exprimă CLDN18.2" sau "boală asociată cu celule care exprimă CLDN18.2" sau expresii similare înseamnă conform invenției că CLDN18.2 este exprimată în celulele unui țesut sau organ bolnav. Într-o aplicare, expresia CLDN18.2 în celulele unui țesut sau organ bolnav este mărită față de starea unui țesut sau organ sănătos. O creștere se referă la o creștere cu cel puțin 10%, în special cel puțin 20%, cel puțin 50%, cel puțin 100%, cel puțin 200%, cel puțin 500%, cel puțin 1000%, cel puțin 10000% sau chiar mai mult. Într-o aplicare, expresia este detectată numai într-un țesut bolnav, în timp ce expresia într-un țesut sănătos este reprimată. Conform invenției, bolile asociate cu celule care exprimă CLDN18.2 includ boli canceroase. De asemenea, conform invenției, bolile canceroase sunt de preferință cele în care celulele canceroase exprimă CLDN18.2.

Termenii "boală canceroasă" sau "cancer" se referă la sau descriu starea fiziologică a unui individ caracterizată în mod tipic prin creștere celulară neregulată. Exemplele de cancere includ, nelimitativ, carcinom, limfom, blastom, sarcom și leucemie. Mai specific, exemplele de cancere includ cancer osos, cancer sanguin, cancer pulmonar, cancer hepatic, cancer pancreatic, cancer de piele, cancer la cap sau gât, melanom cutanat sau intraocular, cancer uterin, cancer ovarian, cancer rectal, cancer al regiunii anale, cancer stomacal, cancer de colon, cancer mamar, cancer de prostată, cancer uterin, carcinom al organelor sexuale și reproducătoare, boala Hodgkin, cancer esofagian, cancer de intestin subțire, cancer al sistemului endocrin, cancer de glandă tiroidiană, cancer de glandă paratiroidiană, cancer de glandă suprarenală, sarcomul țesutului moale, cancer vezical, cancer renal, carcinom cu celule renale, carcinom de pelvis renal, neoplasme ale sistemului nervos central (SNC), cancer neuroectodermic, tumori de canal spinal, gliom, meningiom și adenom pituitar. Termenul "cancer" conform invenției cuprinde și metastaze canceroase. De preferință, o "boală canceroasă" se caracterizează prin celule care exprimă

CLDN18.2 și o celulă canceroasă exprimă CLDN18.2. O celulă care exprimă CLDN18.2 este de preferință o celulă canceroasă, de preferință asociată cu cancerul descris în prezenta.

Conform invenției, termenul "tumoare" sau "boală tumorală" se referă la o creștere anormală a celulelor (denumite celule neoplazice, celule tumorigene sau celule tumorale) care formează de preferință o umflătură sau leziune. Prin "celulă tumorală" se înțelege o celulă anormală care crește printr-o proliferare celulară rapidă și necontrolată și continuă să crească și după încetarea stimulilor care au inițiat creșterea. Tumorile prezintă absență parțială sau completă a organizării structurale și coordonării funcționale cu țesutul normal și formează de obicei o masă de țesut distinctă, care poate fi benignă, pre-malignă sau malignă. Conform invenției, o "boală canceroasă" este de preferință o "boală tumorală".

Totuși, în general, termenii "cancer" și "tumoare" se utilizează în prezenta interschimbabil. Într-o aplicare, un cancer conform invenției implică celule canceroase care exprimă CLDN18.2. Într-o aplicare, cancerul este pozitiv la CLDN18.2. Într-o aplicare, expresia CLDN18.2 este la suprafața celulelor. Într-o aplicare, cel puțin 50%, de preferință 60%, 70%, 80% sau 90% dintre celulele canceroase sunt pozitive la CLDN18.2 și/sau cel puțin 40%, de preferință cel puțin 50% dintre celulele canceroase sunt pozitive pentru expresia la suprafață a CLDN18.2. Într-o aplicare, cel puțin 95% sau cel puțin 98% dintre celulele canceroase sunt pozitive la CLDN18.2. Într-o aplicare, cel puțin 60%, cel puțin 70%, cel puțin 80% sau cel puțin 90% dintre celulele canceroase sunt pozitive pentru expresia la suprafață a CLDN18.2.

Într-o aplicare, un cancer care exprimă CLDN18.2, un cancer care implică celule canceroase care exprimă CLDN18.2 sau un cancer pozitiv la CLDN18.2 este selectat din grupul constând din cancer gastric, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer pulmonar cum ar fi cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer ovarian, cancer de colon, cancer hepatic, cancer la cap și gât și cancer de vezică biliară și metastazele acestora, în special metastaza cancerului gastric cum ar fi tumori Krukenberg, metastază peritoneală și metastază ganglionară limfatică. Într-o aplicare, cancerul este un adenocarcinom, în special un adenocarcinom avansat. Bolile canceroase preferate în mod special sunt adenocarcinoame de stomac, esofag, duct pancreatic, ducte biliare, plămân și ovar. Într-o aplicare, cancerul este selectat din grupul constând din cancer stomacal, cancer esofagian, în special de esofag inferior, cancerul joncțiunii esogastrice și cancer gastro-esofagian. Într-o aplicare deosebit de preferată, cancerul este cancer gastro-esofagian cum ar fi cancer gastro-esofagian avansat metastatic, refractar sau recurent.

Conform invenției, un "carcinom" este o tumoare malignă derivată din celule epiteliale. Acest grup reprezintă cele mai comune cancere, inclusiv formele comune ale cancerului mamar, de prostată, pulmonar și de colon.

"Adenocarcinomul" este un cancer care își are originea în țesutul glandular. Acest țesut face parte de asemenea dintr-o categorie tisulară mai mare cunoscută ca țesut epitelial. Țesutul epitelial include pielea, glandele și o varietate de alte țesuturi care căptușesc cavitățile și organele corpului. Epiteliul provine embriologic din ectoderm, endoderm și mezoderm. Pentru a fi clasificat ca adenocarcinom, celulele nu trebuie să facă parte neapărat dintr-o glandă, atâta vreme cât au proprietăți secretoare. Această formă de carcinom poate apărea la unele mamifere superioare, inclusiv la oameni. Adenocarcinoamele bine diferențiate tind să se asemene cu țesutul glandular din care provin, ceea ce poate să nu se întâmple cu cele slab diferențiate. Prin colorarea celulelor dintr-o biopsie, un patolog va stabili dacă tumoarea este un adenocarcinom sau un alt tip de cancer. Adenocarcinoamele pot apărea în multe țesuturi ale corpului pe baza naturii ubicue a glandelor în corp. Deși este posibil ca glandele să nu secrete toate aceași substanță, atâta vreme cât există o funcție exocrină a celulei, este considerat glandular și forma sa malignă este numită așadar adenocarcinom. Adenocarcinoamele maligne invadează alte țesuturi și adesea metastazează dacă le este lăsat suficient timp. Adenocarcinomul ovarian este cel mai frecvent tip de carcinom ovarian. Include adenocarcinoamele seroase și mucinoase, adenocarcinomul cu celule clare și adenocarcinomul endometrioid.

Prin "metastază" se înțelege răspândirea celulelor canceroase din locul lor inițial într-o altă parte a corpului. Formarea metastazei este un proces foarte complex și depinde de desprinderea celulelor maligne de tumoarea primară, invazia matricei extracelulare, pătrunderea în membranele bazale endoteliale pentru a intra în cavități și vase ale corpului și, după ce au fost transportate prin sânge, infiltrația în organe țintă. În sfârșit, creșterea unei noi tumori la locul țintă depinde de angiogeneză. Metastaza apare adesea chiar și după îndepărtarea tumorii primare, deoarece celulele tumorale sau unele componente pot rămâne și pot dezvolta potențial metastatic. Într-o aplicare, termenul "metastază" conform invenției se referă la "metastază distantă", care se referă la o metastază îndepărtată de tumoarea primară și sistemul ganglionar limfatic regional. Într-o aplicare, termenul "metastază" conform invenției se referă la metastază în ganglioni limfatici. O formă specifică a metastazei care este tratabilă prin terapie din invenție este metastaza care provine din cancer pancreatic ca situs primar. În aplicări preferate,

această metastază a cancerului gastric este tumoarea Krukenberg, metastază peritoneală și/sau metastază în ganglioni limfatici.

Tumoarea Krukenberg este o tumoare metastatică neobișnuită a ovarului, reprezentând 1% până la 2% din toate tumorile ovariene. Prognosticul tumorii Krukenberg este încă foarte slab și nu există tratament stabilit pentru tumorile Krukenberg. Tumoarea Krukenberg este un adenocarcinom metastatic ovarian cu celule în inel cu pecete. Stomacul este situsul primar în majoritatea cazurilor de tumori Krukenberg (70%). Carcinoamele de colon, apendice și sân (în principal carcinom lobular invaziv) sunt următoarele situsuri primare mai frecvente. Au fost raportate cazuri rare de tumoare Krukenberg provenită din carcinoame ale vezicii biliare, tractului biliar, pancreasului, intestinului subțire, ampulei lui Vater, colului uterin și vezicii urinare/urachus. Intervalul dintre diagnosticul unui carcinom primar și descoperirea ulterioară a implicării ovarului este de obicei de 6 luni sau mai puțin, dar s-au raportat și perioade mai lungi. În multe cazuri, tumoarea primară este foarte mică și poate să nu fie detectată. Un istoric de carcinom anterior la stomac sau un alt organ poate fi obținut numai în 20% până la 30% dintre cazuri.

Pacienții cu tumori Krukenberg au o rată totală de mortalitate semnificativ de mare. Majoritatea pacienților mor în primii 2 ani (supraviețuire medie, 14 luni). Mai multe studii arată că prognosticul este slab când tumoarea primară este identificată după ce se descoperă metastaza în ovar și prognosticul este și mai rău dacă tumoarea primară rămâne ascunsă.

Nu s-a stabilit nici o strategie optimă de tratament pentru tumorile Krukenberg în literatură. Nu s-a pus în mod corespunzător problema dacă ar trebui efectuată o rezecție chirurgicală. Chimioterapia sau radioterapia nu are nici un efect semnificativ asupra prognosticului la pacienți cu tumori Krukenberg.

Termenul "tratament (terapeutic)", în mod specific în legătură cu tratamentul cancerului în sensul folosit în prezenta, se referă la orice tratament care vizează îmbunătățirea stării de sănătate și/sau prelungirea (creșterea) vieții unui pacient. Tratamentul poate elimina cancerul, poate reduce dimensiunea sau numărul tumorilor la un pacient, poate opri sau încetini dezvoltarea cancerului la un pacient, poate inhiba sau încetini dezvoltarea unui cancer nou la un pacient, poate scădea frecvența sau gravitatea simptomelor la un pacient și/sau poate reduce recidivele la un pacient care are în prezent sau a avut în trecut cancer. Un tratament (terapeutic) al cancerului poate fi selectat din grupul constând din chirurgie, chimioterapie, radioterapie și terapie direcționată.

Termenul "chirurgie", în sensul folosit în prezenta, include îndepărtarea tumorilor într-o operație și este un tratament comun pentru cancer. Un chirurg poate îndepărta tumorile prin excizie locală.

Termenul "chimioterapie", în sensul folosit în prezenta, se referă la utilizarea agenților chimioterapeutici sau a combinațiilor de agenți chimioterapeutici de preferință pentru a opri creșterea celulelor canceroase prin distrugerea celulelor sau oprirea diviziunii acestora. Când chimioterapia se administrează oral sau se injectează într-o venă sau un mușchi, medicamentele intră în fluxul sanguin și pot ajunge la celulele canceroase prin corp (chimioterapie sistemică). Când chimioterapia se furnizează direct în lichidul cefalorahidian, un organ sau o cavitate corporală precum abdomenul, medicamentele afectează în principal celulele canceroase din aceste zone (chimioterapie regională).

Agenții chimioterapeutici conform invenției includ compuși citostatici și compuși citotoxici. Agenții chimioterapeutici tradiționali acționează prin distrugerea celulelor care se divid rapid, una dintre proprietățile principale ale majorității celulelor canceroase. Aceasta înseamnă că chimioterapia dăunează și celulelor care se divid rapid în circumstanțe normale, cum ar fi celulele din măduva osoasă, tractul digestiv și foliculii de păr. Acest lucru are ca rezultat cele mai frecvente efecte secundare ale chimioterapiei. Conform invenției, termenul "chimioterapie" nu include de preferință anticorpi care ținesc proteinele exprimate anormal în celule canceroase (antigene tumorale cum ar fi CLDN18.2) și acționează prin recrutarea sistemului imunitar al pacientului pentru a distruge celulele tumorale. Anticorpii care ținesc proteine exprimate anormal în celule canceroase (antigene tumorale cum ar fi CLDN18.2) și acționează printr-un fragment terapeutic sau un agent conjugat cu anticorpii pot fi însă considerați o formă de chimioterapie. Cu toate acestea, în sensul cel mai strict, termenul "chimioterapie" conform invenției nu include terapie direcționată.

Conform invenției, termenul "terapie direcționată" se referă la orice terapie care poate fi utilizată pentru a ținti preferențial celule bolnave, cum ar fi celule canceroase, în timp ce celulele care nu sunt bolnave nu sunt țintite sau sunt țintite într-o mai mică măsură. Țintirea celulelor bolnave duce de preferință la distrugerea și/sau perturbarea proliferării sau viabilității celulelor bolnave. O astfel de terapie include i) anticorpi, fragmente de anticorpi și proteine simple sau conjugate cu o fracțiune terapeutică ce vizează anumite ținte de pe suprafața celulelor bolnave, cum ar fi antigene tumorale, de exemplu, CLDN18.2 (de ex., anticorpi sau conjugați de anticorpi împotriva CLDN18.2 așa cum se descrie în prezenta) sau ii) molecule mici care perturbă proliferarea sau viabilitatea celulelor bolnave. Într-o aplicare specifică, agentul se leagă de un antigen exprimat la un nivel mai mare pe celule stem bolnave

decât pe cele normale. Într-o aplicare specifică, agentul se leagă în mod specific de un antigen tumoral. Chimioterapia sau radioterapia tradițională nu este considerată o "terapie direcționată" în ciuda faptului că este adesea direcționată la tumori. În plus, termenul "terapie cu anticorpi" conform invenției nu include de preferință terapia cu anticorpi, fragmente sau derivați ai acestora care sunt conjugați cu o fracțiune terapeutică, ci se referă doar la terapia cu anticorpi, fragmente sau derivați ai acestora care acționează prin recrutarea sistemului imunitar al pacientului pentru a distruge celulele tumorale.

În contextul prezentei invenții, termenii precum "protejează", "previne" sau "profilactic" se referă la prevenirea apariției și/sau propagării unei boli la un subiect și, în mod specific, la minimizarea riscului ca un subiect să dezvolte o boală sau la întârzierea dezvoltării unei boli. De exemplu, un subiect predispus la risc de cancer ar fi un candidat pentru terapia de prevenire a cancerului.

Prin "predispus la risc" se înțelege un subiect identificat ca având un risc mai mare decât normal de dezvoltare a unei boli, în mod specific cancer, în comparație cu populația generală. În plus, un subiect care a suferit sau suferă în prezent de o boală, în mod specific cancer, este un subiect care prezintă un risc mărit de dezvoltare a unei boli, deoarece un astfel de subiect poate continua să dezvolte o boală. Subiecții care suferă sau au suferit de un cancer prezintă de asemenea risc mărit de metastaze.

Termenii "individ" și "subiect" se folosesc în prezenta interschimbabil și se referă la oameni, primare sau alte mamifere (de ex. șoareci, șobolani, iepuri, câini, pisici, vite, porci, oi, cai sau primare) care pot fi afectate sau sunt dispuse la o boală sau tulburare (de ex., cancer), dar care pot să prezinte sau nu boala sau tulburarea. În multe aplicări, individul este un om. Dacă nu se menționează altceva, termenii "individ" și "subiect" nu indică o anumită vârstă, incluzând așadar adulți, bătrâni, copii și nou născuți. În aplicări preferate ale prezentei invenții, "individul" sau "subiectul" este un "pacient". Termenul "pacient" înseamnă conform invenției un subiect pentru tratament, în mod specific un subiect bolnav.

Termenul "antigen" se referă la un agent cum ar fi o proteină sau peptidă cuprinzând un epitop împotriva căruia este direcționat și/sau va fi direcționat un răspuns imun. Într-o aplicare preferată, un antigen este un antigen asociat cu o tumoare, cum ar fi CLDN18.2, adică un constituent al celulelor canceroase care poate proveni din citoplasmă, suprafața și nucleul celulelor, în mod specific acele antigene care sunt produse, de preferință în cantitate mare, intracelular sau ca antigene de suprafață pe celule canceroase.

În contextul prezentei invenții, termenul "antigen asociat cu o tumoare" sau "antigen tumoral" se referă de preferință la proteine care, în condiții normale, sunt exprimate în mod specific într-un număr limitat de țesuturi și/sau organe sau în stadii de dezvoltare specifice și sunt exprimate sau exprimate aberant într-unul sau mai multe țesuturi tumorale sau canceroase. În contextul prezentei invenții, antigenul asociat cu o tumoare este asociat de preferință cu suprafața unei celule canceroase și de preferință nu este exprimat sau este doar rareori exprimat în țesuturi normale.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic într-o moleculă, adică la partea dintr-o moleculă care este recunoscută de sistemul imunitar, de exemplu, recunoscută de un anticorp. De exemplu, epitopii reprezintă situsurile tridimensionale separate pe un antigen, care sunt recunoscute de sistemul imunitar. Epitopii constau de obicei din grupările de suprafață active chimic ale moleculelor precum aminoacizi sau catenele laterale de zahăr și au de obicei caracteristici structurale tridimensionale specifice, precum și caracteristici de sarcină specifice. Epitopii conformaționali și neconformaționali se disting prin aceea că legarea de primii, dar nu și de ceilalți, se pierde în prezența solvenților de denaturare. Un epitop al unei proteine cum ar fi CLDN18.2 conține de preferință o porțiune continuă sau discontinuă a proteinei respective și are de preferință o lungime între 5 și 100, de preferință între 5 și 50, mai preferabil între 8 și 30, cel mai preferabil între 10 și 25 de aminoacizi, de exemplu, epitopul poate avea de preferință o lungime de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 sau 25 de aminoacizi.

Termenul "anticorp" include o glicoproteină cuprinzând cel puțin două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfidice și orice moleculă care conține o porțiune de legare a antigenului a unei astfel de glicoproteine. Termenul "anticorp" include anticorpi monoclonali, anticorpi recombinanți, anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi himerici, molecule cuprinzând fragmente de legare sau derivați de anticorp, inclusiv, nelimitativ, anticorpi monocatenari, de ex. scFv și fragmente de anticorp de legare a antigenului, cum ar fi fragmente Fab și Fab', și include de asemenea toate formele recombinante ale anticorpilor, de ex., anticorpi exprimați în procariote, anticorpi neglicozilați și orice fragmente și derivați ai anticorpilor de legare a antigenului descriși în prezenta. Fiecare lanț greu este alcătuit dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici VH) și o regiune constantă a lanțului greu. Fiecare lanț ușor este alcătuit dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici VL) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunile VH și VL pot fi subîmpărțite mai departe în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni determinante de complementaritate (CDR), intercalate cu regiuni mai conservate, denumite regiuni cadru (FR). Fiecare VH și VL este alcătuit din trei CDR și patru FR, dispuse de la capătul amino la capătul carboxi în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4. Regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare conțin un domeniu de legare care interacționează cu un antigen. Regiunile constante ale anticorpilor pot media legarea imunoglobulinei de țesuturile gazdă sau factori, inclusiv diferite celule ale sistemului imunitar (de ex., celule efectoare) și prima componentă (Clq) a sistemului clasic al complementului.

Termenul "anticorp monoclonal", în sensul folosit în prezenta, se referă la un preparat de molecule de anticorp având o singură compoziție moleculară. Un anticorp monoclonal prezintă o singură specificitate și afinitate de legare. Într-o aplicare, anticorpii monoclonali sunt produși de un hibridom care include o celulă B obținută de la un animal, de ex., șoarece, fuzionată cu o celulă imortalizată.

Termenul "anticorp recombinant", în sensul folosit în prezenta, include toți anticorpii care sunt preparați, extrinși, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi (a) anticorpi izolați de la un animal (de ex., un șoarece) transgenic sau transcromozomial în ceea ce privește genele imunoglobulinice sau un hibridom preparat din aceștia, (b) anticorpi izolați dintr-o celulă gazdă transformată să exprime anticorpul, de ex., dintr-un transfectom, (c) anticorpi izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi combinatorială, recombinantă și (d) anticorpi preparați, extrinși, creați sau izolați prin orice alte mijloace care implică matisarea secvențelor genice imunoglobulinice în alte secvențe ADN.

Termenul "anticorp uman", în sensul folosit în prezenta, include anticorpi având regiuni variabile și constante provenite din secvențe imunoglobulinice ale liniei germinale umane. Anticorpii umani pot include reziduuri aminoacidice necodificate de secvențe imunoglobulinice ale liniei germinale umane (de ex., mutații introduse prin mutagenază aleatorie sau specifică situsului in vitro sau prin mutație somatică in vivo).

Termenul "anticorp umanizat" se referă la o moleculă având un situs de legare a antigenului care provine în mare măsură dintr-o imunoglobulină de la o specie non-umană, iar restul structurii imunoglobulinice a moleculei se bazează pe structura și/sau secvența unei imunoglobuline umane. Situsul de legare a antigenului poate cuprinde domeniile variabile complete fuzionate pe domeniile constante sau numai regiunile determinante de complementaritate (CDR) grefate pe regiunile cadru corespunzătoare în domeniile variabile. Situsurile de legare a antigenului pot fi de tip sălbatic sau modificate cu una sau mai multe substituții aminoacidice, de ex. modificate să semene mai îndeaproape cu imunoglobulinele umane. Unele forme de anticorpi umanizați își păstrează toate secvențele CDR (de exemplu un anticorp de șoarece umanizat care conține toate cele șase CDR din anticorpul de șoarece). Alte forme au una sau mai multe CDR modificate față de anticorpul original.

Termenul "anticorp himeric" se referă la acei anticorpi în care o porțiune a fiecăreia dintre secvențele aminoacidice ale lanțurilor grele și ușoare este omoloagă cu secvențele corespondente din anticorpii proveniți de la o anumită specie sau aparținând unei anumite clase, iar restul segmentului lanțului este omolog cu secvențele corespondente dintr-o altă specie sau clasă. În mod tipic, regiunea variabilă a lanțurilor ușoare și grele imită regiunile variabile ale anticorpilor proveniți dintr-o specie de mamifere, în timp ce porțiunile constante sunt omoloage cu secvențele anticorpilor proveniți de la o altă specie. Un avantaj evident al acestor forme himerice este că regiunea variabilă poate proveni în mod convenabil din surse cunoscute în prezent folosind celule B disponibile sau hibridomi din organisme gazdă non-umane în combinație cu regiuni constante provenite, de exemplu, din preparate celulare umane. Dacă regiunea variabilă are avantajul ușurinței de preparare și specificitatea nu este afectată de sursă, regiunea constantă fiind umană, este mai puțin probabil să determine un răspuns imun de la un subiect uman când anticorpii sunt injectați decât dacă regiunea constantă ar proveni dintr-o sursă non-umană. Totuși, definiția nu se limitează la acest exemplu specific.

Termenii "porțiuni de legare a antigenului" a unui anticorp (sau mai simplu "porțiuni de legare") sau "fragment de legare a antigenului" al unui anticorp (sau mai simplu "fragment de legare") sau termenii similari se referă la unul sau mai multe fragmente ale unui anticorp care rețin capacitatea de a se lega specific de un antigen. S-a arătat că funcția de legare a antigenului a unui anticorp poate fi îndeplinită de fragmente ale unui anticorp în lungime completă. Exemplele de fragmente de legare cuprinse în termenul "porțiuni de legare a antigenului" a unui anticorp includ (i) fragmente Fab, fragmente monovalente constând din domeniile VL, VH, CL și CH; (ii) fragmente F(ab')₂, fragmente bivalente cuprinzând două fragmente Fab legate printr-o punte disulfidică la regiunea de legătură; (iii) fragmente Fd constând din domeniile VH și CH; (iv) fragmente Fv constând din domeniile VL și VH ale unei singure ramificații a unui anticorp, (v) fragmente dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), care constă dintr-un domeniu VH; (vi) regiuni izolate determinante de complementaritate (CDR) și (vii) combinații de două sau mai multe CDR izolate care pot fi opțional unite printr-un linker sintetic. De asemenea, deși cele două domenii ale fragmentului Fv, VL și VH, sunt codificate de gene separate, pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic care le permite formarea ca un singur lanț proteic în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma molecule monovalente (cunoscute ca Fv monocatenar (scFv); vezi de ex., Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; și Huston et al. (1988) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Acești anticorpi monocatenari sunt de asemenea incluși în termenul "fragment de legare a antigenului" al unui anticorp. Un alt exemplu este reprezentat de proteinele de fuziune imunoglobulinice cu domeniu de legare cuprinzând (i) o polipeptidă cu domeniu de legare fuzionată cu o polipeptidă cu regiune de legătură imunoglobulinică, (ii) o regiune constantă CH2 a lanțului greu al imunoglobulinei fuzionată cu regiunea de legătură și (iii) o regiune constantă CH3 a lanțului greu al imunoglobulinei fuzionată cu regiunea constantă CH2. Polipeptida cu domeniu de legare poate fi o regiune variabilă a lanțului greu sau o regiune variabilă a lanțului ușor. Proteinele de fuziune imunoglobulinice cu domeniu de legare sunt descrise mai detaliat în US 2003/0118592 și US 2003/0133939. Aceste fragmente de anticorp sunt obținute prin tehnici convenționale cunoscute în domeniu și fragmentele sunt selectate cu privire la utilitate în același mod precum anticorpii intacti.

Anticorpii naturali sunt în general monospecifici, adică se leagă de un singur antigen. Prezenta invenție cuprinde anticorpi care se leagă de o celulă țintă (prin cuplare cu un antigen tumoral) și o a doua entitate cum ar fi o celulă citotoxică (de ex. prin cuplare cu receptorul CD3). Anticorpii din prezenta invenție pot fi bispecifici sau multispecifici, cum ar fi trispecifici, tetraspecifici etc.

Termenul "moleculă bispecifică" include un agent care are două specificități de legare diferite. De exemplu, molecula se poate lega de sau poate interacționa cu (a) un antigen de pe suprafața celulară cum ar fi CLDN18.2 și (b) un receptor cum ar fi un receptor Fc de pe suprafața unei celule efectoare. Termenul "moleculă multispecifică" include un agent care are mai mult de două specificități de legare diferite. De exemplu, molecula se poate lega de sau poate interacționa cu (a) un antigen de pe suprafața celulară cum ar fi CLDN18.2, (b) un receptor cum ar fi un receptor Fc de pe suprafața unei celule efectoare și (c) cel puțin încă o componentă. Prin urmare, termenul "anticorp" include, nelimitativ, molecule bispecifice, trispecifice, tetraspecifice și multispecifice direcționate către un antigen tumoral și alte ținte, cum ar fi receptori Fc pe celule efectoare. Termenul "anticorpi bispecifici" include de asemenea diacorpi. Diacorpii sunt anticorpi bispecifici, bivalenți, în care domeniile VH și VL sunt exprimate pe un singur lanț polipeptidic, dar folosind un linker care este prea scurt pentru a permite împerecherea între cele două domenii de pe același lanț, forțând astfel domeniile să se împerecheze cu domenii complementare ale unui alt lanț și creând două situsuri de legare a antigenului (vezi de ex., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Anticorpii pot proveni de la specii diferite, inclusiv, nelimitativ, șoarece, șobolan, iepure, porcușor de guinea și om.

În sensul folosit în prezenta, "izotip" se referă la clasa anticorpului (de ex., IgM sau IgG1), care este codificată de genele regiunii constante a lanțului greu.

În sensul folosit în prezenta, "schimbarea izotipului" se referă la fenomenul prin care clasa sau izotipul unui anticorp se schimbă de la o clasă Ig la o altă clasă Ig.

Anticorpii descriși în prezenta includ IgA, cum ar fi anticorpi IgA1 sau IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM și IgD. În diferite aplicări, anticorpul este un anticorp IgG1, mai specific un izotip IgG1, kappa sau IgG1, lambda (adică IgG1, κ, λ), un anticorp IgG2a (de ex. IgG2a, κ, λ), un anticorp IgG2b (de ex. IgG2b, κ, λ), un anticorp IgG3 (de ex. IgG3, κ, λ) sau un anticorp IgG4 (de ex. IgG4, κ, λ).

În sensul folosit în prezenta, un "anticorp heterolog" este definit în raport cu un organism transgenic care produce un astfel de anticorp. Acest termen se referă la un anticorp având o secvență de aminoacizi sau o secvență de acid nucleic de codificare corespunzând celui care se găsește într-un organism care nu constă din organismul transgenic și provenind în general de la o altă specie decât organismul transgenic.

În sensul folosit în prezenta, un "anticorp heterohibrid" se referă la un anticorp având lanțuri ușoare și grele provenite din organisme diferite. De exemplu, un anticorp având un lanț greu uman asociat cu un lanț ușor murin este un anticorp heterohibrid.

Anticorpii descriși în prezenta sunt de preferință izolați. Un "anticorp izolat", în sensul folosit în prezenta, se referă la un anticorp în mare măsură lipsit de alți anticorpi având specificități antigenice diferite (de ex., un anticorp izolat care se leagă specific de un antigen tumoral este în mare măsură lipsit de anticorpi care leagă specific alte antigene decât antigenul tumoral). Un anticorp izolat care se leagă specific de un epitop, izoformă sau variantă a unui antigen tumoral uman poate avea însă reactivitate încrucișată cu alte antigene înrudite, de ex., de la altă specie (de ex., omologi de specie ai antigenului tumoral). Mai mult, un anticorp izolat poate fi în mare măsură lipsit de alte materiale celulare și/sau agenți chimici. Într-o aplicare a invenției, o combinație de anticorpi monoclonali "izolați" se referă la anticorpi având specificități diferite și fiind combinați într-o compoziție sau amestec bine definit.

În contextul prezentei invenții, un anticorp poate acționa prin recrutarea sistemului imunitar al pacientului pentru a distruge celule tumorale dacă anticorpul, în mod specific când este legat de ținta sa cum ar fi un antigen tumoral pe o celulă bolnavă, determină funcții efectoare imune descrise în prezenta.

De preferință, aceste funcții efectoare imune sunt direcționate împotriva celulelor precum celulele canceroase prezentând un antigen tumoral cum ar fi CLDN18.2 pe suprafața lor.

Termenul "funcții efectoare imune", în contextul prezentei invenții, include orice funcții mediate de componente ale sistemului imunitar care au ca rezultat, de ex., inhibarea creșterii tumorale și/sau inhibarea dezvoltării tumorilor, inclusiv inhibarea răspândirii și metastazei tumorii. De preferință, funcțiile efectoare imune duc la distrugerea celulelor canceroase. Aceste funcții cuprind citotoxicitatea dependentă de complement (CDC), citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp (ADCC), fagocitoza mediată celular dependentă de anticorp (ADCP), inducerea apoptozei în celule care prezintă antigenul tumoral, citoliza celulelor care prezintă antigenul tumoral și/sau inhibarea înmulțirii celulelor purtătoare de antigen tumoral.

Citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp

ADCC descrie capacitatea de distrugere celulară a celulelor efectoare, în special a limfocitelor, care necesită de preferință marcarea celulei țintă cu un anticorp.

ADCC apare de preferință atunci când anticorpul se leagă de antigene pe celule tumorale și domeniile Fc ale anticorpului leagă receptorii Fc (FcR) pe suprafața celulelor efectoare imunitare. Au fost identificate mai multe familii de receptori Fc și populațiile celulare specifice exprimă în mod caracteristic receptori Fc definiți. ADCC poate fi văzută ca un mecanism de a induce în mod direct un grad variabil de distrugere tumorală imediată care duce la prezentarea antigenului și inducerea răspunsurilor T celulare direcționate către tumoare. De preferință, inducerea in vivo a ADCC va duce la răspunsuri T celulare direcționate către tumoare și răspunsuri ale anticorpului derivat din gazdă.

Citotoxicitate dependentă de complement

CDC este o altă metodă de distrugere celulară care poate fi controlată de anticorpi. IgM este cel mai eficient izotip pentru activarea complementului. IgG1 și IgG3 sunt de asemenea foarte eficienți în conducerea CDC prin calea clasică de activare a complementului. De preferință, în această cascadă, formarea complexelor antigen-anticorp duce la expunerea situsurilor de legare C1q multiple în strânsă apropiere pe domeniile CH2 ale moleculelor de anticorp participante, cum ar fi molecule IgG (C1q este una dintre cele trei subcomponente ale complementului C1). De preferință, aceste situsuri de legare C1q expuse transformă interacțiunea C1q-IgG anterior de mică afinitate într-una cu aviditate mare, care inițiază o cascadă de evenimente care implică o serie de alte proteine ale complementului și duce la eliberarea proteolitică a agenților C3a și C5a chemotactici/de activare a celulelor efectoare. De preferință, cascada complementului se termină cu formarea unui complex de atac membranar, care creează pori în membrana celulară care facilitează trecerea liberă a apei și a substanțelor dizolvate în și din celulă.

S-a descoperit în mod surprinzător că acești conjugați anticorp-medicament descriși în prezenta pot media distrugerea celulelor, în special a celulelor care exprimă CLDN18.2, cum ar fi celulele canceroase, prin inducerea lizei mediate de citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) și/sau prin inducerea lizei mediate de citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC). Astfel, într-o aplicare, conjugații anticorp-medicament din invenție mediază distrugerea celulelor prin inducerea lizei mediate de citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) și/sau a lizei mediate de citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC), de preferință prin inducerea lizei mediate de CDC și a lizei mediate de ADCC.

În sensul folosit în prezenta, un anticorp este "derivat" dintr-o anumită secvență a liniei germinale dacă anticorpul este obținut dintr-un sistem prin imunizarea unui animal sau prin selectarea unei biblioteci de gene imunoglobulinice și unde anticorpul selectat este cel puțin 90%, mai preferabil cel puțin 95%, încă mai preferabil cel puțin 96%, 97%, 98% sau 99% identic în ceea ce privește secvența de aminoacizi cu secvența de aminoacizi codificată de gena imunoglobulinei din linia germinală. În mod tipic, un anticorp derivat dintr-o anumită secvență a liniei germinale va prezenta nu mai mult de 10 diferențe aminoacidice, mai preferabil nu mai mult de 5 sau încă mai preferabil nu mai mult de 4, 3, 2 sau 1 diferență de aminoacizi față de secvența de aminoacizi codificată de gena imunoglobulinică a liniei germinale.

În sensul folosit în prezenta, termenul "heteroanticorpi" se referă la doi sau mai mulți anticorpi, derivați ai acestora sau regiuni de legare a antigenului legate, dintre care cel puțin două au specificități diferite. Aceste specificități diferite includ o specificitate de legare pentru un receptor Fc pe o celulă efectoare și o specificitate de legare pentru un antigen sau epitop pe o celulă țintă, de ex. o celulă tumorală.

Termenul "transfectom", în sensul folosit în prezenta, include celule gazdă eucariote recombinante care exprimă un anticorp, cum ar fi celule CHO, NS/0, HEK293, HEK293T, celule de plante sau celule de ciuperci, inclusiv celule de drojdie.

Specificația include toți anticorpul și derivații anticorpilor descriși în prezenta care, conform invenției, sunt incluși în termenul "anticorp". Termenul "derivați de anticorp" se referă la orice formă

modificată a unui anticorp, de ex., un conjugat al anticorpului și un alt agent sau anticorp sau un fragment de anticorp.

Termenul "anticorp împotriva unui antigen tumoral" sau termeni similari se referă la un anticorp direcționat la sau capabil să se lege de antigenul tumoral. Termenul "legare" conform invenției se referă de preferință la o legare specifică.

Conform prezentei invenții, un anticorp sau un conjugat anticorp-medicament se poate lega de o țintă predeterminată dacă are o afinitate semnificativă pentru ținta predeterminată respectivă și se leagă de aceasta în teste standard. "Afinitate" sau "afinitate de legare" se măsoară adesea prin constanta de disociere (K_D). De preferință, termenul "afinitate semnificativă" se referă la legarea de o țintă predeterminată cu o constantă de disociere (K_D) de 10^{-5} M sau mai mică, 10^{-6} M sau mai mică, 10^{-7} M sau mai mică, 10^{-8} M sau mai mică, 10^{-9} M sau mai mică, 10^{-10} M sau mai mică, 10^{-11} M sau mai mică sau 10^{-12} M sau mai mică.

Un anticorp sau un conjugat anticorp-medicament nu este (în mare măsură) capabil de legare de o țintă dacă nu are afinitate semnificativă pentru ținta respectivă și nu se leagă semnificativ, în mod specific nu se leagă detectabil, de ținta respectivă în teste standard. De preferință, anticorpul sau conjugatul anticorp-medicament nu se leagă detectabil de țintă dacă este prezent într-o concentrație de până la 2, de preferință 10, mai preferabil 20, în mod specific 50 sau 100 $\mu\text{g/ml}$ sau mai mare. De preferință, un anticorp sau conjugat anticorp-medicament nu are afinitate semnificativă pentru o țintă dacă se leagă de ținta respectivă cu un K_D care este de cel puțin 10 ori, 100 de ori, 10^3 ori, 10^4 ori, 10^5 ori sau 10^6 ori mai mare decât K_D pentru legare de ținta predeterminată de care anticorpul sau conjugatul anticorp-medicament se poate lega. De exemplu, dacă K_D pentru legarea unui anticorp sau conjugat anticorp-medicament de ținta de care anticorpul sau conjugatul anticorp-medicament se poate lega este 10^{-7} M, K_D pentru legarea de o țintă pentru care anticorpul sau conjugatul anticorp-medicament nu are afinitate semnificativă ar fi de cel puțin 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M sau 10^{-1} M.

Un anticorp sau un conjugat anticorp-medicament este specific pentru o țintă predeterminată dacă se poate lega de acea țintă predeterminată fără a se putea lega de alte ținte, adică nu are afinitate semnificativă pentru alte ținte și nu se leagă semnificativ de alte ținte în teste standard. Conform invenției, un anticorp sau conjugat anticorp-medicament este specific pentru un antigen tumoral precum CLDN18.2 dacă este capabil de legare de antigenul tumoral, dar nu este (în mare măsură) capabil de legare de alte ținte. De preferință, un anticorp sau conjugat anticorp-medicament este specific pentru un antigen tumoral dacă afinitatea și legarea de alte ținte nu depășește semnificativ afinitatea sau legarea de proteine neînrudite cu antigenul tumoral, cum ar fi albumină serică bovină (BSA), cazeină, albumină serică umană (HSA) sau proteine transmembranare non-antigen tumoral, cum ar fi molecule MHC sau receptorul pentru transferină sau orice altă polipeptidă specificată. De preferință, un anticorp sau conjugat anticorp-medicament este specific pentru o țintă predeterminată dacă se leagă de ținta respectivă cu un K_D care este cel puțin de 10 ori, 100 de ori, 10^3 ori, 10^4 ori, 10^5 ori sau 10^6 ori mai mic decât K_D pentru legare de o țintă pentru care nu este specific. De exemplu, dacă K_D pentru legarea unui anticorp sau conjugat anticorp-medicament de ținta pentru care este specific este 10^{-7} M, K_D pentru legarea de o țintă pentru care nu este specific ar fi cel puțin 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M sau 10^{-1} M.

Legarea unui anticorp de o țintă poate fi determinată experimental prin orice metodă adecvată; vezi, de exemplu, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992) și metodele descrise aici. Afinitățile pot fi determinate cu ușurință prin tehnici convenționale, cum ar fi prin dializă de echilibru; folosind instrumentul BIAcore 2000, urmând procedurile generale indicate de producător; prin radioimunoanaliză folosind antigen țintă radiomarcate; sau prin alte metode cunoscute în domeniu. Datele de afinitate pot fi analizate, de exemplu, prin metoda lui Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Afinitatea măsurată a unei anumite interacțiuni anticorp-antigen poate varia dacă este măsurată în condiții diferite, de ex., concentrația sării, pH. Astfel, măsurătorile de afinitate și alți parametri de legare a antigenului, de ex., K_D , IC_{50} , se realizează de preferință cu soluții standardizate de anticorp și antigen și o soluție tampon standardizată.

Termenul "care apare în mod natural", în sensul folosit în prezenta, aplicat unui obiect se referă la faptul că obiectul respectiv poate fi găsit în natură. De exemplu, o secvență polipeptidică sau polinucleotidică prezentă într-un organism (inclusiv virusuri) care poate fi izolată dintr-o sursă din natură și care nu a fost modificată intenționat de om în laborator apare în mod natural.

Termenul "reordonat", în sensul folosit în prezenta, se referă la o configurație a unui locus imunoglobulinic al lanțului greu sau ușor, unde un segment V este poziționat imediat lângă un segment D-J sau J într-o conformațiune care codifică în esență un domeniu VH sau VL complet. Un locus genic (anticorp) imunoglobulinic reordonat poate fi identificat în comparație cu ADN din linia germinală; un locus reordonat va avea cel puțin un element de omologie heptamer/nonamer recombinat.

Termenul "neordonat" sau "configurația liniei germinale", în sensul folosit în prezenta, referindu-se la un segment V, înseamnă configurația în care segmentul V nu este recombinat astfel încât să se afle imediat lângă un segment D sau J.

Conform invenției un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este un anticorp capabil să se lege de un epitop prezent în CLDN18.2, de preferință un epitop situat în domeniile extracelulare ale CLDN18.2, în mod specific primul domeniu extracelular, de preferință pozițiile aminoacidice de la 29 la 78 din CLDN18.2. În aplicări specifice, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este un anticorp capabil să se lege de (i) un epitop pe CLDN18.2 care nu este prezent pe CLDN18.1, de preferință SEQ ID NO: 3, 4 și 5, (ii) un epitop localizat pe CLDN18.2-buc1, de preferință SEQ ID NO: 8, (iii) un epitop localizat pe CLDN18.2-buc2, de preferință SEQ ID NO: 10, (iv) un epitop localizat pe CLDN18.2-buc3, de preferință SEQ ID NO: 11, (v) un epitop, incluzând CLDN18.2-buc1 și CLDN18.2-buc3 sau (vi) un epitop neglicozilat localizat pe CLDN18.2-buc3, de preferință SEQ ID NO: 9.

Conform invenției un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este de preferință un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2, dar nu de CLDN18.1. De preferință, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este specific pentru CLDN18.2. De preferință, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este de preferință un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 exprimată pe suprafața celulară. În aplicări preferate, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 se leagă de epitopi naturali ai CLDN18.2 prezenți pe suprafața celulelor vii. De preferință, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 se leagă de una sau mai multe peptide selectate din grupul constând din SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 și 48-50. De preferință, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este specific pentru proteinele menționate mai sus, peptidele sau fragmentele imunogenice sau derivații lor. Un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 poate fi obținut printr-o metodă cuprinzând etapa de imunizare a unui animal cu o proteină sau peptidă cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 și 48-50 sau un acid nucleic sau o celulă gazdă care exprimă proteina sau peptida respectivă. De preferință, anticorpul se leagă de celule canceroase, în mod specific celulele tipurilor de cancer menționate mai sus și, de preferință, nu se leagă substanțial de celule necanceroase.

Într-un aspect preferat în mod special al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este produs printr-un hibridom depus la DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germania; adresă nouă: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germania) și având următoarea denumire și număr de referință:

- a. 182-D1106-055, nr. de referință DSM ACC2737, depus în 19 octombrie 2005
- b. 182-D1106-056, nr. de referință DSM ACC2738, depus în 19 octombrie 2005
- c. 182-D1106-057, nr. de referință DSM ACC2739, depus în 19 octombrie 2005
- d. 182-D1106-058, nr. de referință DSM ACC2740, depus în 19 octombrie 2005
- e. 182-D1106-059, nr. de referință DSM ACC2741, depus în 19 octombrie 2005
- f. 182-D1106-062, nr. de referință DSM ACC2742, depus în 19 octombrie 2005,
- g. 182-D1106-067, nr. de referință DSM ACC2743, depus în 19 octombrie 2005
- h. 182-D758-035, nr. de referință DSM ACC2745, depus în 17 noiembrie 2005
- i. 182-D758-036, nr. de referință DSM ACC2746, depus în 17 noiembrie 2005
- j. 182-D758-040, nr. de referință DSM ACC2747, depus în 17 noiembrie 2005
- k. 182-D1106-061, nr. de referință DSM ACC2748, depus în 17 noiembrie 2005
- l. 182-D1106-279, nr. de referință DSM ACC2808, depus în 26 octombrie 2006
- m. 182-D1106-294, nr. de referință DSM ACC2809, depus în 26 octombrie 2006,
- n. 182-D1106-362, nr. de referință DSM ACC2810, depus în 26 octombrie 2006.

Anticorpii preferați conform invenției sunt cei produși prin și obținuți din hibridomii descriși mai sus; adică 37G11 în cazul 182-D1106-055, 37H8 în cazul 182-D1106-056, 38G5 în cazul 182-D1106-057, 38H3 în cazul 182-D1106-058, 39F11 în cazul 182-D1106-059, 43A11 în cazul 182-D1106-062, 61C2 în cazul 182-D1106-067, 26B5 în cazul 182-D758-035, 26D12 în cazul 182-D758-036, 28D10 în cazul 182-D758-040, 42E12 în cazul 182-D1106-061, 125E1 în cazul 182-D1106-279, 163E12 în cazul 182-D1106-294 și 175D10 în cazul 182-D1106-362; și formele lor himerizate și umanizate.

Într-un aspect al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este un anticorp selectat din grupul constând din (i) un anticorp produs de și/sau obținut dintr-o clonă depusă sub nr. de referință. 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 sau DSM ACC2810, (ii) un anticorp reprezentând o formă himerizată sau umanizată a anticorpului de la (i), (iii) un anticorp având specificitatea anticorpului de la (i) și (iv) un anticorp cuprinzând porțiunea de legare a antigenului sau situsul de legare a antigenului, în mod specific regiunea variabilă, a anticorpului de la (i) și de preferință având specificitatea anticorpului de la (i).

Anticorprii preferați, în mod specific anticorprii himerizați și secvențele lor se indică în următorul tabel

	clonă	mAb	Izotip	regiune variabilă	anticorp himerizat
lanț greu	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
lanț ușor	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

În aplicări preferate, anticorprii, în mod specific formele himerizate ale anticorpilor conform invenției includ anticorpi cuprinzând o regiune constantă a lanțului greu (CH) care conține o secvență de aminoacizi provenită dintr-o regiune constantă a lanțului greu uman cum ar fi secvența de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 13 sau un fragment al acesteia. În alte aplicări preferate, anticorprii, în mod specific formele himerizate ale anticorpilor conform invenției includ anticorpi cuprinzând o regiune constantă a lanțului ușor (CL) cuprinzând o secvență de aminoacizi derivată dintr-o regiune constantă a lanțului ușor uman cum ar fi secvența de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 12 sau un fragment al acesteia. Într-o anumită aplicare preferată, anticorprii, în mod specific formele himerizate ale anticorpilor conform invenției, includ anticorpi care conțin o CH cuprinzând o secvență de aminoacizi derivată dintr-o CH umană cum ar fi secvența de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 13 sau un fragment al acesteia și care cuprinde o CL cuprinzând o secvență de aminoacizi derivată dintr-o CL umană cum ar fi secvența de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 12 sau un fragment al acesteia.

Într-o aplicare, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 este un anticorp monoclonal IgG1 murin/uman himeric cuprinzând lanțul ușor variabil murin kappa, alotipul Km(3) al regiunii constante a lanțului ușor kappa uman, regiunea variabilă a lanțului greu murin, regiunea constantă IgG1 umană, alotip G1m(3).

În anumite aplicări preferate, formele himerizate ale anticorpilor includ anticorpi cuprinzând un lanț greu care conține o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 51 și un fragment al acesteia și/sau cuprinzând un lanț ușor care conține o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 și un fragment al acesteia.

În anumite aspecte preferate ale invenției, formele himerizate ale anticorpilor includ anticorpi cuprinzând o combinație de lanțuri grele și lanțuri ușoare selectate din următoarele posibilități de la (i) la (ix):

- (i) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 14 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 21 sau un fragment al acesteia,
- 5 (ii) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 15 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 20 sau un fragment al acesteia,
- (iii) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 16 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 22 sau un fragment al acesteia,
- 10 (iv) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 18 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 25 sau un fragment al acesteia,
- (v) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia,
- 15 (vi) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 19 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 23 sau un fragment al acesteia,
- (vii) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 19 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 26 sau un fragment al acesteia,
- 20 (viii) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 19 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 27 sau un fragment al acesteia,
- 25 (ix) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 19 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 28 sau un fragment al acesteia și
- (x) lanțul greu cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 51 sau un fragment al acesteia și lanțul ușor cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia.
- 30 Anticorpii conform (ii), (v) sau (x) sunt aplicări preferate ale unui "anticorp capabil să se lege de CLDN18.2". Se preferă în special anticorpii conform (v) sau (x).
- Fragment" sau "fragment al unei secvențe de aminoacizi", în sensul folosit mai sus, se referă la o parte dintr-o secvență de anticorp, adică o secvență care reprezintă secvența anticorpului scurtată la capătul N și/sau C și care, atunci când înlocuiește secvența de anticorp respectivă într-un anticorp reține legarea aceluia anticorp de CLDN18.2. De preferință, un fragment al unei secvențe de aminoacizi conține cel puțin 80%, de preferință cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% din reziduurile aminoacidice ale secvenței de aminoacizi. Un fragment al unei secvențe de aminoacizi selectate din grupul constând din SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 și 51 se referă de preferință la
- 40 secvența respectivă din care sunt îndepărtați 17, 18, 19, 20, 21, 22 sau 23 de aminoacizi la capătul N.
- Într-un aspect preferat al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (VH) cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 și un fragment al acesteia.
- Într-un aspect preferat al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde o
- 45 regiune variabilă a lanțului ușor (VL) cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 și un fragment al acesteia.
- În anumite aspecte preferate ale invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 conține o combinație de regiune variabilă a lanțului greu (VH) și regiune variabilă a lanțului ușor (VL) selectată din următoarele posibilități de la (i) la (ix):
- 50 (i) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 29 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 36 sau un fragment al acesteia,
- (ii) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35 sau un fragment al acesteia,
- (iii) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 31 sau un fragment al acesteia și
- 55 VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 37 sau un fragment al acesteia,
- (iv) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 33 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 40 sau un fragment al acesteia,
- (v) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39 sau un fragment al acesteia,

(vi) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 34 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 38 sau un fragment al acesteia,
 (vii) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 34 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 41 sau un fragment al acesteia,
 5 (viii) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 34 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 42 sau un fragment al acesteia,
 (ix) VH conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 34 sau un fragment al acesteia și VL conține o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 43 sau un fragment al acesteia.

Anticorpii conform (ii) sau (v) sunt aplicări preferate ale unui "anticorp capabil să se lege
 10 de CLDN18.2". Se preferă în special anticorpii conform (v).

Conform invenției, termenul "fragment" se referă în mod specific la una sau mai multe dintre regiunile determinante de complementaritate (CDR), de preferință cel puțin regiunea variabilă CDR3, ale regiunii variabile a lanțului greu (VH) și/sau ale regiunii variabile a lanțului ușor (VL). Într-o aplicare, aceste una sau mai multe dintre regiunile determinante de complementaritate (CDR) sunt selectate dintr-
 15 un set de regiuni determinante de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3. Într-o aplicare deosebit de preferată, termenul "fragment" se referă la regiunile determinante de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu (VH) și/sau ale regiunii variabile a lanțului ușor (VL).

Într-un aspect preferat al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde o VH conținând un set de regiuni determinante de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 selectate dintre
 20 următoarele aplicări de la (i) la (vi):

- (i) CDR1: pozițiile 45-52 ale SEQ ID NO: 14, CDR2: pozițiile 70-77 ale SEQ ID NO: 14, CDR3: pozițiile 116-125 ale SEQ ID NO: 14,
- (ii) CDR1: pozițiile 45-52 ale SEQ ID NO: 15, CDR2: pozițiile 70-77 ale SEQ ID NO: 15, CDR3: pozițiile 116-126 ale SEQ ID NO: 15,
- 25 (iii) CDR1: pozițiile 45-52 ale SEQ ID NO: 16, CDR2: pozițiile 70-77 ale SEQ ID NO: 16, CDR3: pozițiile 116-124 ale SEQ ID NO: 16,
- (iv) CDR1: pozițiile 45-52 ale SEQ ID NO: 17, CDR2: pozițiile 70-77 ale SEQ ID NO: 17, CDR3: pozițiile 116-126 ale SEQ ID NO: 17,
- (v) CDR1: pozițiile 44-51 ale SEQ ID NO: 18, CDR2: pozițiile 69-76 ale SEQ ID NO: 18, CDR3: pozițiile 115-125 ale SEQ ID NO: 18 și
- 30 (vi) CDR1: pozițiile 45-53 ale SEQ ID NO: 19, CDR2: pozițiile 71-78 ale SEQ ID NO: 19, CDR3: pozițiile 117-128 ale SEQ ID NO: 19.

Într-un aspect preferat al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde o VL conținând un set de regiuni determinante de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 selectate dintre
 35 următoarele aplicări de la (i) la (ix):

- (i) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 20, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 20, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 20,
- (ii) CDR1: pozițiile 49-53 ale SEQ ID NO: 21, CDR2: pozițiile 71-73 ale SEQ ID NO: 21, CDR3: pozițiile 110-118 ale SEQ ID NO: 21,
- 40 (iii) CDR1: pozițiile 47-52 ale SEQ ID NO: 22, CDR2: pozițiile 70-72 ale SEQ ID NO: 22, CDR3: pozițiile 109-117 ale SEQ ID NO: 22,
- (iv) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 23, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 23, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 23,
- (v) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 24, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 24, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 24,
- 45 (vi) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 25, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 25, CDR3: pozițiile 115-122 ale SEQ ID NO: 25,
- (vii) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 26, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 26, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 26,
- 50 (viii) CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 27, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 27, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 27 și
- (ix) CDR1: pozițiile 47-52 ale SEQ ID NO: 28, CDR2: pozițiile 70-72 ale SEQ ID NO: 28, CDR3: pozițiile 109-117 ale SEQ ID NO: 28.

Într-un aspect preferat al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde o
 55 combinație de VH și VL, cuprinzând fiecare un set de regiuni determinante de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 selectate dintre următoarele aplicări de la (i) la (ix):

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

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

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

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

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

(vi) VH: CDR1: pozițiile 45-53 ale SEQ ID NO: 19, CDR2: pozițiile 71-78 ale SEQ ID NO: 19, CDR3: pozițiile 117-128 ale SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: pozițiile 47-58 ale SEQ ID NO: 23, CDR2: pozițiile 76-78 ale SEQ ID NO: 23, CDR3: pozițiile 115-123 ale SEQ ID NO: 23,

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

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

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

Anticorpii conform (ii) sau (v) sunt aplicări preferate ale unui "anticorp capabil să se lege de CLDN18.2". Se preferă în special anticorpii conform (v).

În alte aspecte preferate ale invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde de preferință una sau mai multe dintre regiunile determinate de complementaritate (CDR), de preferință cel puțin regiunea variabilă CD3, din regiunea variabilă a lanțului greu (VH) și/sau regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) a unui anticorp monoclonal împotriva CLDN18.2, de preferință a unui anticorp monoclonal împotriva CLDN18.2 descris în prezenta, și de preferință cuprinde una sau mai multe dintre regiunile determinate de complementaritate (CDR), de preferință cel puțin regiunea variabilă CD3, din regiunile variabile ale lanțului greu (VH) și/sau regiunile variabile ale lanțului ușor (VL) descrise în prezenta. Într-un aspect al invenției, aceste una sau mai multe dintre regiunile determinate de complementaritate (CDR) sunt selectate dintr-un set de regiuni determinate de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3, descrise în prezenta. Într-un aspect preferat în mod special al invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 cuprinde de preferință regiunile determinate de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii variabile a lanțului greu (VH) și/sau ale regiunii variabile a lanțului ușor (VL) a unui anticorp monoclonal împotriva CLDN18.2, de preferință a unui anticorp monoclonal împotriva CLDN18.2, descris în prezenta, și de preferință cuprinde regiunile determinate de complementaritate CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunilor variabile ale lanțului greu (VH) și/sau ale regiunilor variabile ale lanțului ușor (VL) descrise în prezenta.

Într-un aspect al invenției, un anticorp cuprinzând una sau mai multe CDR, un set de CDR sau o combinație de seturi de CDR descrise în prezenta cuprinde CDR respective împreună cu regiunile lor cadru. De preferință, porțiunea va include de asemenea cel puțin circa 50% din una sau ambele dintre prima și a patra regiune cadru, 50% reprezentând 50% C-terminal din prima regiune cadru și 50% N-terminal din a patra regiune cadru. Realizarea anticorpilor prin tehnici ADN recombinant poate avea ca rezultat introducerea reziduurilor N sau C-terminale în regiunile variabile codificate de linkerii introduși pentru a facilita clonarea sau alte etape de manipulare, inclusiv introducerea linkerilor pentru a uni regiunile variabile din invenție cu alte secvențe proteice, inclusiv lanțurile grele ale imunoglobulinei, alte domenii variabile (de exemplu în producerea diacorpilor) sau marcatori proteici.

Într-un aspect al invenției, un anticorp cuprinzând una sau mai multe CDR, un set de CDR sau o combinație de seturi de CDR descrise în prezenta cuprinde CDR respective într-un cadru de anticorp uman.

Când se menționează în prezenta că un anticorp cuprinde, în ceea ce privește lanțul său greu, un anumit lanț sau o anumită regiune sau secvență, aceasta indică de preferință situația în care toate lanțurile grele ale anticorpului cuprind lanțul, regiunea sau secvența respectivă. Aceasta se aplică în mod corespunzător și lanțului ușor al unui anticorp.

Într-o aplicare, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 conform invenției se referă la un anticorp care recunoaște, i.e. se leagă de același sau în esență același epitop precum un anticorp care se leagă de CLDN18.2 descris în prezenta și/sau concurează cu acel anticorp care se leagă de CLDN18.2 pentru legarea de CLDN18.2.

Conform invenției, un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2, în mod specific când este prezent în conjugatul anticorp-medicament, are de preferință o afinitate și/sau specificitate pentru CLDN18.2 corespunzătoare pentru a permite endocitoza anticorpului și/sau conjugatului anticorp-medicament.

Termenul "endocitoză" se referă la procesul prin care celulele eucariote internalizează segmente din membrana plasmatică, receptori de suprafață celulară și componente din fluidul extracelular. Mecanismele de endocitoză includ endocitoza mediată de receptor. Termenul "endocitoză mediată de receptor" se referă la un mecanism biologic prin care un ligand, la legarea de ținta sa, declanșează invaginația membranei, este internalizat și furnizat în citosol sau transferat în compartimentele intracelulare adecvate.

Prezenta invenție are de asemenea în vedere aplicări în care un "anticorp capabil să se lege de CLDN18.2" include sneusl de "agent de legare de CLDN18.2". Conform invenției, un "agent de legare de CLDN18.2" include orice compus având capacitate de legare de CLDN18.2. De preferință, acest agent de legare cuprinde cel puțin un domeniu de legare pentru CLDN18.2. Termenul include toate moleculele de legare artificiale (matrițe) având capacitate de legare de CLDN18.2 inclusiv, nelimitativ, nanocorpi, molecule affibody, anticaline, DARPin, monocorpi, avimeri și microcorpi. Într-o aplicare agentul de legare se leagă de un domeniu extracelular al CLDN18.2. Într-o aplicare agentul de legare se leagă de epitopi naturali ai CLDN18.2 prezenți pe suprafața celulelor vii. Într-o aplicare agentul de legare se leagă de prima buclă extracelulară a CLDN18.2. Într-o aplicare legarea de CLDN18.2 este o legare specifică.

Termenul "domeniu de legare" caracterizează în legătură cu prezenta invenție o structură, de ex. a unui anticorp, care se leagă de/interacționează cu o structură/un antigen/epitop țintă. Astfel, domeniul de legare conform invenției desemnează un "situs de interacțiune cu antigenul".

Orice agent care exercită un efect terapeutic asupra celulelor canceroase poate fi folosit ca medicament pentru conjugare cu un anticorp anti-CLDN18.2 sau un derivat al acestuia. De preferință, conjugarea medicamentului nu modifică sau nu modifică semnificativ caracteristicile de legare, în special specificitatea anticorpului discutată în prezenta. Astfel, conjugatul anticorp-medicament conform invenției are de preferință aceleași sau în esență aceleași caracteristici de legare, în special specificitatea, precum anticorpul folosit pentru conjugare. Astfel, dacă se descriu în prezenta anumite caracteristici de legare pentru anticorpul folosit pentru conjugare, se preferă ca și conjugatul anticorp-medicament să aibă aceste caracteristici de legare. De exemplu, dacă se descrie că anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 se leagă de un domeniu extracelular al CLDN18.2 și/sau se leagă de prima buclă extracelulară a CLDN18.2, se preferă ca și conjugatul anticorp-medicament să se lege de un domeniu extracelular al CLDN18.2 și/sau să se lege de prima buclă extracelulară a CLDN18.2.

În mod tipic, medicamentul este un agent citotoxic sau citostatic. O citotoxină sau un agent citotoxic include orice agent care este dăunător celulelor și, în mod specific, care le distruge.

C clasele utile de agenți citotoxici includ, de exemplu, agenți antitubulină, lianți ai șanțului minor ADN (de ex., enediyne și lexitropsine), inhibitori de replicare ADN, agenți de alchilare (de ex., complecși de platină precum cis-platină, mono(platină), bis(platină) și complecși de platină trinucleari și carboplatină), antraciclone, antibiotice, antifolați, antimetaboliți, chimiosensibilizatori, duocarmicine, etoposide, pirimidine fluorurate, ionofori, nitrosouree, platinoli, compuși de preformare, antimetaboliți purinici, puromicine, radiosensibilizatori, steroizi, taxani (de ex., paclitaxel și docetaxel), inhibitori de topoizomerază, alcaloizi vinca etc..

Agenții citotoxici individuali includ, de exemplu, un androgen, antramicină (AMC), asparaginază, 5-azacitidină, azatioprină, bleomicină, busulfan, butionin sulfoximină, camptotecina, carboplatina, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucil, cisplatina, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citidin arabinozid, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anterior actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrogen, 5-fluorodeoxiuridina, 5-fluorouracil, gramicidina D, hidroxiuree, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalan, 6-mercaptapurina, metotrexat, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, streptozotocina, tenoposid, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecan, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 și VM-26.

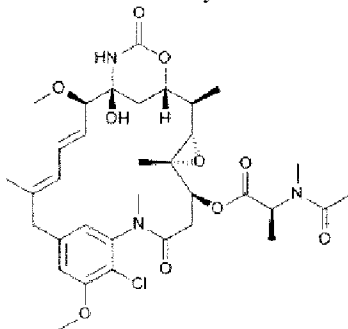
Exemplele de agenți anti-tubulină includ, nelimitativ, dolastatine (de ex., auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB), maytansinoide, taxani (de ex., paclitaxel, docetaxel), T67 (Tularik), alcaloizi vinca (de ex., vincristina, vinblastina, vindesina și vinorelbina), derivați de baccatin, analogi ai

taxanului (de ex., epothilone A și B), nocodazol, colchicina și colcimid, estramustina, cryptophysin, cernadotin, combretastatin, discodermolid și eleutherobin.

În aplicări specifice, agentul citotoxic sau citostatic este auristatina E (cunoscut în domeniu și ca dolastatin-10) sau un derivat al acesteia. În mod tipic, derivatul auristatinei E este, de ex., un ester format între auristatina E și un acid keto. De exemplu, auristatina E poate reacționa cu acid benzoic paraacetil sau acid benzoilvaleric pentru a produce AEB și AEVB. Alți derivați tipici ai auristatinei includ AFP, MMAF și MMAE.

În anumite aplicări, agentul citotoxic sau citostatic este un maytansinoid, un alt grup de agenți anti-tubulină. De exemplu, în aplicări specifice, maytansinoid este maytansina, DM-1 sau DM-4.

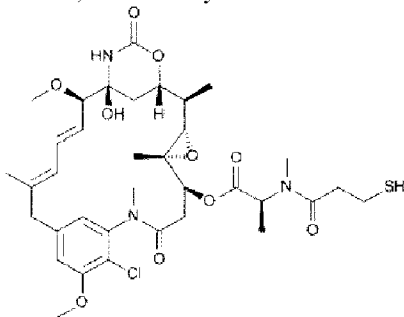
Maytansinoidele reprezintă compuși potenți direcționați către microtubuli, care inhibă înmulțirea celulelor la mitoză. Maytansinoidele sunt derivați ai maytansinei reprezentând o structură ansa macrolid cu 19 membri atașată de un inel de benzen clorurat. Maytansina are următoarea formulă:



S-a descoperit că anumiți microbi produc și maytansinoide, cum ar fi maytansinol și C-3 maytansinol esteri (brevetul U.S. nr. 4,151,042). S-au raportat compuși maytansinol sintetici și analogi de maytansinol, de exemplu, în brevetele U.S. nr. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,362,663; și 4,371,533 și Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451.

Compușii maytansinoid sunt bine cunoscuți în domeniu și pot fi sintetizați prin tehnici cunoscute sau izolați din surse naturale. Compușii maytansinoid preferați în mod special conform invenției sunt derivații conținând tiol ai maytansinei, cum ar fi DM1 și DM4. Acești derivați conținând tiol ai maytansinei includ compuși în care grupa metil legată de grupa carbonil este înlocuită de o grupă conținând o grupă sulfhidril liberă cum ar fi grupa -R-SH, unde R reprezintă o grupă alchilen sau o altă grupă de atomi conținând carbon.

DM1, cunoscut și ca mertansina, este un maytansinoid având următoarea formulă:



În mod specific, termenul "mertansina" sau "DM1" se referă la compusul *N*²-deacetil-*N*²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maytansina.

"DM4" se referă la compusul *N*²-deacetil-*N*²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maytansina.

Conjugații de anticorp anti-CLDN18.2-maytansinoid se pot prepara prin legarea chimică a unui anticorp anti-CLDN18.2 de o moleculă de maytansinoid fără diminuarea semnificativă a activității biologice a anticorpului sau moleculei de maytansinoid. Se poate conjuga o medie de 3-4 molecule de maytansinoid per moleculă de anticorp, deși se estimează că și o moleculă de toxină/anticorp mărește citotoxicitatea față de utilizarea anticorpului simplu.

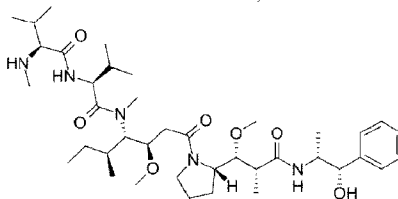
În această privință, termenul "anticorp atașat covalent de cel puțin o fracțiune medicamentoasă toxică" include situații în care una sau mai multe molecule ale aceluiași medicament sunt atașate covalent de o moleculă de anticorp, precum și în care sunt atașate covalent medicamente diferite de o moleculă de anticorp. În această a doua situație, una sau mai multe molecule ale fiecăruia dintre diferitele

medicamente pot fi atașate de o moleculă de anticorp sau o combinație a acestora (de ex. este atașată o moleculă a unui medicament și sunt atașate mai multe molecule ale unui alt medicament).

În unele aplicări ale invenției, un anticorp este conjugat cu dolastatine sau analogi peptidici și derivați ai dolostatinei, auristatine (brevetele US nr. 5,635,483; 5,780,588). Auristatinele sunt analogi sintetici ai dolostatinei 10, un produs natural derivat dintr-o moluscă, *Dolabella auricularia*. Precum maytansinoidele, auristatinele sunt perturbatori ai microtubulilor. Frațiunea medicamentoasă de dolastatină sau auristatină poate fi atașată de anticorp prin capătul N (amino) sau capătul C (carboxil) al fracțiunii medicamentoase peptidice.

Aplicările exemplificative ale auristatinei includ fracțiunile medicamentoase de monometilauristatină cum ar fi MMAE și MMAF, care sunt de preferință legate N-terminal.

MMAE, cunoscută și ca Monometil auristatina E, are următoarea formulă:



În mod specific, termenul "MMAE" se referă la compusul (S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il)amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida. MMAE este de fapt desmetil-auristatina E, adică grupa amino N-terminală are numai un substituent metil în loc de doi ca în auristatina E.

Se preferă în mod special conjugăți de anticorp-vcAuristatina cum ar fi conjugăți de anticorp-vcMMAE. Conform invenției, termenul "anticorp-vcAuristatina" sau "vcMMAE" se referă la un conjugat anticorp-medicament (ADC) cuprinzând o auristatină cum ar fi MMAE, legată printr-un linker cuprinzând dipeptida clivabilă lizozomal, valina-citrulina (vc), de anticorp.

MMAF, cunoscută și ca Monometil auristatina F, se referă la compusul (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-acid fenilpropanoic.

Generarea conjugăților anticorp-medicament poate fi realizată prin orice tehnică cunoscută în domeniu. Conjugății anticorp-medicament pot fi preparați prin legarea medicamentului de un anticorp în conformitate cu o tehnică convențională. Un anticorp și un medicament pot fi legați direct unul de celălalt prin propriile grupe linker sau indirect printr-un linker sau o altă substanță.

Sunt disponibile mai multe reacții diferite pentru atașarea covalentă a medicamentelor de anticorpi. Acest lucru este adesea realizat prin reacția reziduurilor aminoacidice ale moleculei de anticorp, inclusiv grupele amină ale lizinei, grupele de acid carboxilic libere ale acidului glutamic și aspartic, grupele sulfhidril ale cisteinei și diferitele fracțiuni ale aminoacizilor aromatici. Una dintre cele mai frecvente metode nespecifice de atașare covalentă este reacția carbodiimidei pentru legarea unei grupe carboxi (sau amino) a unui compus de grupele amino (sau carboxi) ale anticorpului. În plus, se utilizează agenți bifuncționali cum ar fi dialdehide sau imidoesteri pentru legarea grupei amino a unui compus de grupele amino ale moleculei de anticorp. Pentru atașarea medicamentelor de anticorpi este disponibilă și reacția bazei Schiff. Această metodă presupune oxidarea cu periodat a unui medicament care conține grupe glicol sau hidroxi, formând astfel o aldehydă care reacționează apoi cu molecula de anticorp. Atașarea are loc prin formarea unei baze Schiff cu grupele amino ale moleculei de anticorp. Izotiocianații pot fi de asemenea utilizați ca agenți de cuplare pentru atașarea covalentă a medicamentelor de anticorpi. Se cunosc și alte tehnici în domeniu, care se încadrează în domeniul de aplicare al prezentei invenții.

Există multe grupe de legătură cunoscute în domeniu pentru prepararea conjugăților anticorp-medicament. Un linker cuprinde de preferință una sau mai multe grupe funcționale care reacționează cu unul sau ambii dintre anticorp și medicament. Exemplele de grupe funcționale includ grupele amino, carboxil, mercapto, maleimidă și piridinil.

Într-o aplicare a invenției, un anticorp este legat cu un medicament printr-un reactiv de legare încrucișată bifuncțional. În sensul folosit în prezenta, un "reactiv de legare încrucișată bifuncțional" se referă la un reactiv având două grupe reactive, dintre care una poate reacționa cu un anticorp, iar cealaltă poate reacționa cu medicamentul, legând anticorpul cu medicamentul și formând astfel un conjugat. Se poate folosi orice reactiv de legare încrucișată bifuncțional adecvat în legătură cu invenția, atâta vreme cât reactivul linker asigură reținerea caracteristicilor medicamentului, de ex., citotoxicitatea, și a caracteristicilor de țintire ale anticorpului. De preferință, molecula linker leagă medicamentul de anticorp prin legături chimice, astfel încât medicamentul și anticorpul sunt legați chimic (de ex., legați covalent) unul de celălalt.

Într-o aplicare, reactivul de legare încrucișată bifuncțional cuprinde linkeri neclivabili. Un linker neclivabil este orice fracțiune chimică ce poate lega un medicament, cum ar fi un maytansinoid, de un anticorp într-o manieră covalentă, stabilă. De preferință, un linker neclivabil nu este clivabil în condiții fiziologice, în mod specific într-o celulă. Astfel, linkerii neclivabili sunt în mare măsură rezistenți la clivare indusă de acizi, clivare indusă de lumină, clivare indusă de peptidază, clivare indusă de esterază și clivarea legăturilor disulfurice, în condiții în care medicamentul sau anticorpul rămâne activ. Reactivii de legare încrucișată adecvați care formează linkeri neclivabili între un medicament și un anticorp sunt bine cunoscuți în domeniu. Într-o aplicare, medicamentul este legat de anticorp printr-o legătură tioeterică.

Într-o aplicare deosebit de preferată, reactivul de legare este un linker clivabil. De preferință, un linker clivabil este clivabil în condiții fiziologice, în mod specific într-o celulă. Exemplele de linkeri clivabili adecvați includ linkeri disulfurici, linkeri labili acizi, linkeri fotolabili, linkeri peptidazici labili și linkeri esterazici labili.

Exemplele de linkeri includ, nelimitativ, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirat (SPDB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionat (SPDP), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilat (Sulfo-SMCC), N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexancarboxilat (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxi-(6-amidocaproat) (LC-SMCC), 4-acid maleimidobutiric N-hidroxisuccinimidă ester (GMBS), acid 3-maleimidocaproic N-hidroxisuccinimidă ester (EMCS), m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimidă ester (MBS), N-(α -maleimidoacetoxi)-succinimidă ester (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoat (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirat (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianat (PMPI), 6-maleimidocaproil (MC), maleimidopropanoil (MP), p-aminobenziloxycarbonil (PAB), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoat (SPP) și N-succinimidil (4-iodoacetil)aminobenzoat (SIAB). Se poate folosi și un linker peptidic precum valina-citrulina (Val-Cit) sau alanina-fenilalanina (ala-phe) și oricare dintre linkerii menționați mai sus se pot folosi în combinație adecvată.

Linkerii care conțin disulfură sunt linkeri clivabili prin schimb disulfuric, care poate avea loc în condiții fiziologice. În alte aplicări, linkerul este clivabil în condiții reducătoare (de ex., un linker disulfuric). Se cunoaște în domeniu o varietate de linkeri disulfurici, inclusiv, de exemplu, cei care pot fi formați folosind SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetat), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionat), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirat) și SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil-alpha-(2-piridil-ditio)toluen).

Linkerii labili acizi sunt linkeri clivabili la pH acid. De exemplu, anumite compartimente intracelulare, cum ar fi endozomi și lizozomi, au un pH acid (pH 4-5) și asigură condiții adecvate pentru clivarea linkerilor acizi labili. Linkerii labili acizi sunt relativ stabili în condiții de pH neutru, cum ar fi cele din sânge, dar sunt instabili la sub pH 5.5 sau 5.0. De exemplu, se poate folosi o hidrazonă, semicarbazonă, tiosemicarbazonă, amidă cis-aconitică, ortoester, acetal, ketal etc..

Linkerii fotolabili sunt utili la suprafața corpului și în multe cavități ale corpului accesibile luminii. De asemenea, lumina infraroșie poate pătrunde în țesut.

Linkerii peptidazici labili pot fi folosiți pentru a cliva anumite peptide în interiorul sau exteriorul celulelor. Într-o aplicare, linkerul clivabil este clivat în condiții moderate, și anume condiții într-o celulă în care activitatea agentului citotoxic nu este afectată.

Linkerul poate fi sau poate cuprinde, de ex., un linker peptidil clivat de o enzimă peptidază sau protează intracelulară, inclusiv, nelimitativ, o protează lizozomală sau endozomală. În mod tipic, linkerul peptidil are o lungime de cel puțin doi aminoacizi sau cel puțin trei aminoacizi. Agenții de clivare pot include catepsinele B și D și plasmină, toate fiind cunoscute că hidrolizează derivații medicamentelor dipeptidice, ducând la eliberarea medicamentului activ în celulele țintă. De exemplu, se poate utiliza un linker peptidil clivabil de proteaza catepsina-B dependentă de tiol, care este exprimată la nivel ridicat în țesut canceros (de ex., un linker Phe-Leu sau Gly-Phe-Leu-Gly). În aplicări specifice, linkerul peptidil clivabil de o protează intracelulară este un linker valină-citrulină (Val-Cit; vc) sau un linker fenilalanină-lizină (Phe-Lys). Un avantaj al utilizării eliberării proteolitice intracelulare a agentului terapeutic este că agentul este în mod tipic atenuat atunci când este conjugat și stabilitățile serice ale conjugatelor sunt de obicei ridicate.

Într-o aplicare deosebit de preferată, linkerul conform invenției cuprinde sau constă din dipeptida valina (Val) - citrulina (Cit) (vc), care este clivată de catepsină în celulele tumorale.

Într-o aplicare, medicamentul este un maytansinoid precum DM4, cuplat cu un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 printr-un linker încrucișat de proteină heterobifuncțională reactivă cu amino și sulfhidril care reacționează cu amine primare (care se găsesc în catenele laterale de lizină sau capătul N al proteinelor) ale anticorpului și cu grupa sulfhidril a maytansinoidului pentru a produce o legătură disulfurică reversibilă. Într-o aplicare, linkerul încrucișat de proteină heterobifuncțională reactivă cu

amino și sulfhidril este SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirat), care reacționează printr-un ester de N-hidroxisuccinimidă (NHS) cu amine primare (care se găsesc în catenele laterale de lizină sau capătul N al proteinelor) ale anticorpului și printr-o grupă piridinildisulfidă cu grupa sulfhidril a DM4 pentru a produce o legătură disulfurică reversibilă (Figura 1).

Într-o aplicare, medicamentul este o auristatină precum MMAE, cuplată cu un anticorp capabil să se lege de CLDN18.2 printr-un linker peptidic cum ar fi un linker peptidic clivabil de catepsină, în mod specific Val-Cit (vc). Într-o aplicare, anticorpul care se poate lega de CLDN18.2 este tiolat, de ex. cu linkerul heterobifuncțional 2-IT (2-iminotiolan) care reacționează cu aminele libere ale reziduurilor de lizină.

Într-o aplicare deosebit de preferată, un conjugat anticorp-medicament conform invenției cuprinde un anticorp, cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului, cuplat (de preferință prin grupele sale amino) cu DM4 (de preferință prin grupa sa sulfhidril). Într-o aplicare, anticorpul este cuplat cu DM4 printr-un linker SPDB.

Într-o aplicare, un conjugat anticorp-medicament conform invenției cuprinde un anticorp, cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului, cuplat (de preferință prin grupele sale amino) cu DM4 (de preferință prin grupa sa sulfhidril). Într-o aplicare, anticorpul este cuplat cu DM4 printr-un linker SPDB.

Într-o aplicare deosebit de preferată, un conjugat anticorp-medicament conform invenției cuprinde un anticorp, cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului, cuplat (de preferință prin grupele sale amino) cu MMAE (de preferință prin grupa sa amino N-terminală). Într-o aplicare, anticorpul este cuplat cu MMAE printr-un linker cuprinzând dipeptida vc.

Într-o aplicare deosebit de preferată, un conjugat anticorp-medicament conform invenției cuprinde un anticorp, cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24 sau un fragment al acesteia sau o variantă a acelei secvențe de aminoacizi sau a fragmentului, cuplat (de preferință prin grupele sale amino) cu MMAE (de preferință prin grupa sa amino N-terminală). Într-o aplicare, anticorpul este cuplat cu MMAE printr-un linker cuprinzând dipeptida vc.

Termenul "acid nucleic", în sensul folosit în prezenta, include ADN și ARN. Un acid nucleic poate fi monocatenar sau dublu catenar, dar de preferință este ADN dublu catenar.

Conform invenției, termenul "expresie" se utilizează în sensul său cel mai larg și cuprinde producerea ARN sau a ARN și proteinei/peptidei. Cuprinde și expresie parțială a acizilor nucleici. În plus, expresia poate fi temporară sau stabilă.

Specificația din prezenta cu privire la anumite secvențe de aminoacizi, de ex. cele indicate în lista de secvențe, în mod specific cele indicate în prezenta cu SEQ ID NO:, se va înțelege ca referindu-se de asemenea la variante ale acestor secvențe specifice. Aceste variante de secvențe pot fi echivalente funcțional cu secvențele specifice respective, de ex. secvențe de aminoacizi care prezintă proprietăți identice sau similare cu cele ale secvențelor de aminoacizi specifice. O proprietate importantă este reținerea legării unui anticorp de ținta sa. De preferință, o secvență reprezentând o variantă a unei secvențe specifice, când înlocuiește secvența specifică într-un anticorp, reține legarea anticorpului respectiv de CLDN18.2.

Persoanele cu competențe în domeniu vor înțelege că, în mod specific, secvențele CDR, regiunile hipervariabile și variabile pot fi modificate fără pierderea capacității de legare a CLDN18.2. De exemplu, regiunile CDR vor fi identice sau în mare măsură omoloage cu regiunile anticorpilor specificate în prezenta. Prin "în mare măsură omolog" se înțelege că se pot efectua de la 1 la 5, de preferință de la 1 la 4, cum ar fi 1 până la 3 sau 1 sau 2 substituții în CDR. În plus, regiunile hipervariabile și variabile pot fi modificate astfel încât să prezinte omologie substanțială cu regiunile anticorpilor divulgate în mod specific în prezenta.

Termenul "variantă" conform invenției se referă, în mod specific, la mutații, variante de matisare, conformațiuni, izoforme, variante alelice, variante de specie și omologi de specie, în special cele

care apar în mod natural. O variantă alelică se referă la o modificare a secvenței normale a unei gene, a cărei importanță este adesea neclară. Secvențierea genică completă identifică adesea numeroase variante alelice ale unei gene date. Un omolog de specie este o secvență de acid nucleic sau secvență de aminoacizi cu o specie de origine diferită de cea a unei secvențe date de acid nucleic sau aminoacizi. Termenul "variantă" va include toate variantele modificate post-tranlațional și variantele conformaționale.

În scopul prezentei invenții, "variantele" unei secvențe de aminoacizi cuprind variante de inserție a aminoacizilor, variante de adăugare a aminoacizilor, variante de ștergere a aminoacizilor și/sau variante de substituție a aminoacizilor. Variantele de ștergere a aminoacizilor, care cuprind deleția la capătul N și/sau C al proteinei, sunt denumite de asemenea variante trunchiate N-terminale și/sau C-terminale.

Variantele de inserție a aminoacizilor cuprind inserții de unul sau doi sau mai mulți aminoacizi într-o anumită secvență aminoacidică. În cazul variantelor de secvență de aminoacizi cu o inserție, se introduc unul sau mai multe reziduuri aminoacidice într-un anumit situs dintr-o secvență de aminoacizi, deși este posibilă și inserția aleatorie cu selecție corespunzătoare a produsului rezultat.

Variantele de adăugare a aminoacizilor cuprind fuziuni amino- și/sau carboxi-terminale ale unuia sau mai multor aminoacizi, cum ar fi 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 sau mai mulți aminoacizi.

Variantele de ștergere a aminoacizilor sunt caracterizate prin îndepărtarea unuia sau mai multor aminoacizi din secvență, cum ar fi îndepărtarea a 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 sau mai multor aminoacizi. Ștergerile pot avea loc în orice poziție a proteinei.

Variantele de substituție a aminoacizilor sunt caracterizate prin îndepărtarea a cel puțin unui reziduu din secvență și înlocuirea sa cu un alt reziduu. Se preferă modificările în poziții ale secvenței de aminoacizi care nu sunt conservate între proteine sau peptide omoloage și/sau înlocuirea aminoacizilor cu alții având proprietăți similare. De preferință, modificările aminoacizilor în variantele proteinelor sunt modificări conservative, adică substituții de aminoacizi încărcăți sau neîncărcăți similar. O modificare conservativă implică substituția în cadrul unei familii de aminoacizi înrudiți în catenele laterale. Aminoacizii naturali se împart în general în patru familii: aminoacizi acizi (aspartat, glutamat), bazici (lizină, arginină, histidină), nepolari (alanină, valină, leucină, izoleucină, prolină, fenilalanină, metionină, triptofan) și polari neîncărcăți (glicină, asparagină, glutamină, cisteină, serină, treonină, tirozină). Fenilalanina, triptofanul și tirozina sunt clasificate uneori împreună ca aminoacizi aromatici.

De preferință, gradul de asemănare, de preferință de identitate dintre o secvență aminoacidică dată, cum ar fi o secvență indicată în prezenta cu SEQ ID NO.:, și o secvență de aminoacizi reprezentând o variantă a secvenței date va fi de cel puțin circa 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%. Gradul de similaritate sau identitate este dat de preferință pentru o regiune aminoacidică având cel puțin circa 10%, cel puțin circa 20%, cel puțin circa 30%, cel puțin circa 40%, cel puțin circa 50%, cel puțin circa 60%, cel puțin circa 70%, cel puțin circa 80%, cel puțin circa 90% sau circa 100% din întreaga lungime a secvenței de aminoacizi de referință. De exemplu, dacă secvența aminoacidică de referință constă din 200 de aminoacizi, gradul de similaritate sau identitate este dat de preferință pentru cel puțin circa 20, cel puțin circa 40, cel puțin circa 60, cel puțin circa 80, cel puțin circa 100, cel puțin circa 120, cel puțin circa 140, cel puțin circa 160, cel puțin circa 180 sau circa 200 de aminoacizi, de preferință aminoacizi continui. În aplicări preferate, gradul de similaritate sau identitate este dat pentru întreaga lungime a secvenței aminoacidice de referință. Alinierea în vederea determinării asemănării secvențiale, de preferință a identității secvențiale, se poate realiza cu instrumente cunoscute în domeniu, de preferință folosind cea mai bună aliniere secvențială, de exemplu Align, cu setări standard, de preferință EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Similaritatea secvențială" indică procentajul de aminoacizi care sunt identici sau care reprezintă substituții aminoacidice conservative. "Identitatea secvențială" între două secvențe de aminoacizi indică procentajul de aminoacizi identici între secvențe.

Termenul "identitate procentuală" indică un procentaj al reziduurilor aminoacidice care sunt identice între cele două secvențe comparate, obținute după cea mai bună aliniere, acest procentaj fiind pur statistic și diferențele dintre cele două secvențe fiind distribuite aleatoriu și pe întreaga lor lungime. Comparările dintre cele două secvențe de aminoacizi se efectuează în mod convențional comparând aceste secvențe în urma alinierii optime a acestora, comparația realizându-se pe segmente sau "intervale de comparație" pentru a identifica și compara regiuni locale de similaritate secvențială. Alinierea optimă a secvențelor pentru comparație poate fi realizată, pe lângă cea manuală, cu ajutorul algoritmului de omologie locală al lui Smith & Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, cu algoritmul de omologie locală al lui Needleman & Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, prin metoda de căutare a similarităților a lui Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444 sau prin programe de calculator care

folosesc acești algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N și TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Identitatea procentuală este calculată determinând numărul pozițiilor identice între cele două secvențe comparate, împărțind acest număr la numărul pozițiilor comparate și înmulțind rezultatul obținut cu 100 pentru a obține identitatea procentuală a celor două secvențe.

Termenul "animal transgenic" se referă la un animal având un genom care cuprinde una sau mai multe transgene, de preferință transgenele sau transcromozomii lanțului greu și/sau ușor (integrate sau neintegrate în ADN-ul genomic natural al animalului) și care este de preferință capabil să exprime transgenele. De exemplu, un șoarece transgenic poate avea o transgenă a lanțului ușor uman și o transgenă a lanțului greu uman sau un transcromozom al lanțului greu uman, astfel încât șoarecele să producă anticorpi anti-CLDN18.2 umani când este imunizat cu antigen CLDN18.2 și/sau celule care exprimă CLDN18.2. Transgena lanțului greu uman poate fi integrată în ADN-ul cromozomial al șoarecelui, așa cum este cazul pentru șoareci transgenici, de ex., șoareci HuMAb, cum ar fi șoareci HCo7 sau HCo12 sau transgena lanțului greu uman poate fi păstrată extracromozomial, așa cum este cazul pentru șoarecii transcromozomiali (de ex., KM), conform descrierii din WO 02/43478. Acești șoareci transgenici și transcromozomiali pot fi capabili să producă izotipuri multiple de anticorpi monoclonali umani la CLDN18.2 (de ex., IgG, IgA și/sau IgE) prin recombinare V-D-J și schimbarea izotipului.

"Reducerea", "scăderea" sau "inhibarea", în sensul folosit în prezenta, înseamnă o scădere generală sau capacitatea de a cauza o scădere generală a nivelului, de preferință cu 5% sau mai mult, 10% sau mai mult, 20% sau mai mult, mai preferabil cu 50% sau mai mult și cel mai preferabil cu 75% sau mai mult, de ex. a nivelului de expresie sau înmulțire a celulelor.

Termenii precum "creștere" sau "mărire" se referă de preferință la o creștere sau mărire de aproximativ cel puțin 10%, de preferință cel puțin 20%, de preferință cel puțin 30%, mai preferabil cel puțin 40%, mai preferabil cel puțin 50%, încă mai preferabil cel puțin 80% și cel mai preferabil de cel puțin 100%, cel puțin 200%, cel puțin 500%, cel puțin 1000%, cel puțin 10000% sau chiar mai mult.

Anticorpii descriși în prezenta pot fi produși printr-o varietate de tehnici, inclusiv metodologia convențională a anticorpilor monoclonali, de ex. tehnica de hibridizare celulară somatică standard a lui Kohler & Milstein, Nature 256: 495 (1975). Deși procedurile de hibridizare celulară somatică sunt preferate, în principiu se pot folosi alte tehnici de producere a anticorpilor monoclonali, de ex. transformare virală sau oncogenică a limfocitelor B sau tehnici de prezentare a fagilor folosind biblioteci de gene de anticorp.

Sistemul animal preferat pentru prepararea hibridomilor care secretă anticorpi monoclonali este sistemul murin. Producerea hibridomilor în șoarece este o procedură foarte bine stabilită. Protocoalele și tehnicile de imunizare pentru izolarea splenocitelor imunizate pentru fuziune sunt cunoscute în domeniu. Se cunosc și partenerii de fuziune (de ex., celule de mielom murin) și procedurile de fuziune.

Alte sisteme animale preferate pentru prepararea hibridomilor care secretă anticorpi monoclonali sunt șobolanul și iepurele (descrise de ex. în Spicker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), vezi și Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Într-o altă aplicare preferată, anticorpii monoclonali umani pot fi generați folosind șoareci transgenici sau transcromozomiali care prezintă unele părți din sistemul imunitar uman, nu murin. Acești șoareci transgenici sau transcromozomiali includ șoareci cunoscuți sub denumirea de șoareci HuMAb, respectiv KM și sunt denumiți colectiv în prezenta "șoareci transgenici". Producerea anticorpilor umani în acești șoareci transgenici poate fi realizată așa cum se descrie detaliat pentru CD20 în WO2004 035607.

O altă strategie de generare a anticorpilor monoclonali este izolarea directă a genelor care codifică anticorpi din limfocite, producând anticorpi cu specificitate definită, de ex. vezi Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Pentru detalii cu privire la modificarea recombinantă a anticorpilor, vezi de asemenea Welschof & Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 și Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Pentru generarea anticorpilor, șoarecii pot fi imunizați cu peptide conjugate cu transportor derivate din secvența antigenului, adică secvența împotriva căreia sunt direcționați anticorpii, un preparat îmbogățit de antigen exprimat recombinant sau fragmente ale acestuia și/sau celule care exprimă antigenul, așa cum s-a descris. Alternativ, șoarecii pot fi imunizați cu ADN care codifică antigenul sau fragmente ale acestuia. În cazul în care imunizările folosind un preparat purificat sau îmbogățit de antigen nu produce anticorpi, șoarecii pot fi imunizați de asemenea cu celule care exprimă antigenul, de ex. o linie celulară, pentru a activa răspunsurile imune.

Răspunsul imun poate fi monitorizat în cursul protocolului de imunizare, prelevându-se probe de plasmă și ser din vena din coadă sau retroorbitală. Șoarecii cu titru suficiente de imunoglobulină pot fi utilizați pentru fuziuni. Șoarecii pot primi doze suplimentare intraperitoneale sau intravenoase de celule

care exprimă antigenul cu 3 zile înaintea sacrificării și îndepărtării splinei pentru a crește rata hibridomilor specifici care secretă anticorp.

Pentru a genera hibridomi de producere a anticorpilor monoclonali, se pot izola splenocite și celule din ganglioni limfatici de la șoareci imunizați și se pot fuziona cu o linie celulară imortalizată corespunzătoare, cum ar fi o linie celulară de mielom murin. Hibridomii rezultați pot fi selectați apoi cu privire la producerea anticorpilor antigen-specifiți. Godeurile individuale pot fi analizate prin ELISA cu privire la hibridomii care secretă anticorpi. Prin analiză de imunofluorescență și FACS folosind celule care exprimă antigenul, pot fi identificați anticorpi cu specificitate pentru antigen. Hibridomii care secretă anticorp pot fi reasezați în plăci, reanalizați și, dacă sunt în continuare pozitivi pentru anticorpi monoclonali, pot fi subclonați prin diluție limitativă. Subclonele stabile pot fi cultivate apoi in vitro pentru a genera anticorp în mediu de cultură tisulară pentru caracterizare.

Anticorpii pot fi produși de asemenea într-un transfectom al celulei gazdă folosind, de exemplu, o combinație de tehnici de ADN recombinant și metode de transfecție genică, bine cunoscute în domeniu (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

De exemplu, într-o aplicare, gena/genele de interes, de ex., genele de anticorp, pot fi ligate într-un vector de expresie cum ar fi o plasmidă de expresie eucariotă, precum cea folosită de sistemul de expresie genică GS descris în WO 87/04462, WO 89/01036 și EP 338 841 sau alte sisteme de expresie bine cunoscute în domeniu. Plasmida purificată cu genele de anticorp clonate poate fi introdusă în celule gazdă eucariote cum ar fi celule CHO, NS/0, HEK293T sau HEK293 sau, alternativ, alte celule eucariote precum celule derivate din plante, ciuperci sau drojdii. Metoda folosită pentru a introduce aceste gene poate fi una dintre metodele descrise în domeniu, cum ar fi electroporare, lipofectină, lipofectamină sau altele. După introducerea acestor gene de anticorp în celulele gazdă, celulele care exprimă anticorpul pot fi identificate și selectate. Aceste celule reprezintă transfectomi care pot fi apoi amplificați în ceea ce privește nivelul de expresie și măriți la scară pentru a produce anticorpi. Anticorpii recombinanți pot fi izolați și purificați din acești supernatanți de cultură și/sau celule.

Alternativ, genele de anticorp clonate pot fi exprimate în alte sisteme de expresie, inclusiv celule procariote, cum ar fi microorganisme, de ex. *E. coli*. De asemenea, anticorpii pot fi produși în animale transgenice, cum ar fi în lapte de oaie și iepuri sau în ouă de găină sau în plante transgenice; vezi de ex. Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; și Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Himerizare

Imunogenicitatea anticorpilor murini la om poate fi redusă sau evitată complet dacă respectivii anticorpi sunt himerizați sau umanizați. Anticorpii himerici sunt anticorpi ale căror diferite porțiuni sunt derivate de la specii de animale diferite, cum ar fi cei care prezintă o regiune variabilă derivată dintr-un anticorp murin și o regiune constantă a imunoglobulinei umane. Himerizarea anticorpilor este obținută prin unirea regiunilor variabile ale lanțului greu și ușor al anticorpului murin cu regiunea constantă a lanțului greu și ușor uman (de ex. așa cum se descrie în Kraus et al., *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). Într-o aplicare preferată, anticorpii himerici sunt generați prin îmbinarea regiunii constante a lanțului ușor kappa uman cu regiunea variabilă a lanțului ușor murin. Într-o altă aplicare preferată, anticorpii himerici pot fi generați prin îmbinarea regiunii constante a lanțului ușor lambda uman cu regiunea variabilă a lanțului ușor murin. Regiunile constante ale lanțului greu preferate pentru generarea anticorpilor himerici sunt IgG1, IgG3 și IgG4. Alte regiuni constante ale lanțului greu preferate pentru generarea anticorpilor himerici sunt IgG2, IgA, IgD și IgM.

Umanizare

Anticorpii interacționează cu antigenele țintă predominant prin reziduurile aminoacidice situate în cele șase regiuni determinante de complementaritate (CDR) ale lanțului greu și ușor. Din acest motiv, secvențele de aminoacizi din CDR sunt mai diverse între anticorpi individuali decât secvențele din afara CDR. Deoarece secvențele CDR sunt responsabile pentru majoritatea interacțiunilor anticorp-antigen, este posibilă exprimarea anticorpilor recombinanți care imită proprietățile anticorpilor naturali specifici prin construcția vectorilor de expresie care includ secvențe CDR din anticorpul natural specific grefate pe secvențele cadru de la un anticorp diferit cu proprietăți diferite (vezi, de ex., Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; și Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Aceste secvențe cadru pot fi obținute din baze de date ADN publice care includ secvențe genice de anticorp din linia germinală. Aceste secvențe din linia germinală vor fi diferite de secvențele genice ale anticorpului matur deoarece nu vor include gene variabile complet asamblate, care se formează prin îmbinarea V (D) J în timpul maturizării celulelor B. Secvențele genice din linia germinală se vor deosebi de asemenea de secvențele unui anticorp din repertoriul secundar de mare afinitate uniform în regiunea variabilă.

Capacitatea anticorpilor de legare a unui antigen poate fi determinată prin teste de legare standard (de ex., ELISA, Western Blot, imunofluorescența și analiza citometrică în flux).

Pentru purificarea anticorpilor, pot fi dezvoltati anumiți hibridomi în baloane rotative de doi litri pentru purificarea anticorpilor monoclonali. Alternativ, anticorpii pot fi produși în bioreactoare pe bază de dializă. Supernatanții pot fi filtrați și, dacă este necesar, concentrați înaintea cromatografiei de afinitate cu proteină G-sefaroză sau proteină A-sefaroză. IgG eluat poate fi verificat prin electroforeză în gel și cromatografie lichidă de înaltă performanță pentru a asigura puritatea. Soluția tampon poate fi schimbată în PBS și concentrația poate fi determinată prin OD280 folosind coeficient de extincție 1.43. Anticorpii monoclonali pot fi împărțiți în părți alicote și depozitați la -80°C.

Pentru a determina dacă anticorpii monoclonali selectați se leagă de epitopi unici, se poate folosi mutageneza direcționată spre situs sau situsuri multiple.

Pentru a determina izotipul anticorpilor, se pot efectua analize de izotip ELISA cu diferite kituri din comerț (de ex. Zymed, Roche Diagnostics). Godeurile plăcilor de microtitru pot fi acoperite cu Ig anti-șoarece. După blocare, plăcile sunt reacționate cu anticorpi monoclonali sau control de izotipuri purificate, la temperatura ambiantă timp de două ore. Godeurile pot fi reacționate apoi cu IgG1, IgG2a, IgG2b sau IgG3 de șoarece, IgA sau sonde conjugate cu peroxidază IgM-specifice de șoarece. După spălare, plăcile pot fi dezvoltate cu substrat ABTS (1 mg/ml) și analizate la OD 405-650. Alternativ, se poate utiliza kitul de izotipare a anticorpilor monoclonali de șoarece IsoStrip (Roche, nr. cat. 1493027), conform descrierii producătorului.

Pentru a demonstra prezența anticorpilor în serul șoarecilor imunizați sau legarea anticorpilor monoclonali de celule vii care exprimă antigenul, se poate folosi citometria în flux. Liniile celulare care exprimă antigen în mod natural sau după transfecție și controlul negativ fără expresia antigenului (dezvoltate în condiții standard) pot fi amestecate cu diferite concentrații de anticorpi monoclonali în supernatanți de hibridom sau în PBS conținând 1% FBS și pot fi incubate la 4°C timp de 30 min. După spălare, anticorpii anti IgG marcat cu APC sau Alexa647 se poate lega de anticorp monoclonal legat de antigen în aceleași condiții precum colorarea anticorpului primar. Probele pot fi analizate prin citometrie în flux cu un instrument FACS folosind proprietăți de dispersie a luminii pentru activarea celulelor vii individuale. Pentru a distinge anticorpi monoclonali antigen-specfici de agenți de legare nespecfici într-o singură măsurare, se poate utiliza metoda de co-transfecție. Celulele transfectate temporar cu plasmide care codifică antigen și un marker fluorescent pot fi colorate așa cum s-a descris mai sus. Celulele transfectate pot fi detectate într-un canal de fluorescență diferit de celulele colorate cu anticorp. Având în vedere că majoritatea celulelor transfectate exprimă ambele transgene, anticorpii monoclonali antigen-specfici se leagă preferențial de celule care exprimă markerul de fluorescență, în timp ce anticorpii nespecfici se leagă într-o proporție comparabilă de celule netransfectate. Se poate folosi un test alternativ folosind microscopie de fluorescență pe lângă sau în locul citometriei în flux. Celulele pot fi colorate exact cum s-a descris mai sus și examinate prin microscopie de fluorescență.

Pentru a demonstra prezența anticorpilor în serul șoarecilor imunizați sau legarea anticorpilor monoclonali de celule vii care exprimă antigenul, se poate folosi microscopia de imunofluorescență. De exemplu, liniile celulare care exprimă antigenul spontan sau după transfecție și controlul negativ fără expresie a antigenului sunt dezvoltate în lamele cu mai multe camere în condiții standard de creștere în mediu DMEM/F12, suplimentat cu 10% ser fetal de vițel (FCS), 2 mM L-glutamină, 100 IU/ml penicilină și 100 μg/ml streptomycină. Celulele pot fi fixate apoi cu metanol sau paraformaldehidă sau pot fi lăsate netratate. Celulele pot fi reacționate apoi cu anticorpi monoclonali împotriva antigenului timp de 30 min. la 25°C. După spălare, celulele pot fi reacționate cu un anticorp secundar IgG anti-șoarece marcat cu Alexa555 (Molecular Probes) în aceleași condiții. Celulele pot fi examinate apoi prin microscopie de fluorescență.

Extractele celulare din celule care exprimă antigenul și controlul negativ corespunzător pot fi preparate și supuse electroforezei în gel de sodiu dodecil sulfat (SDS) poliacrilamidă. După electroforeză, antigenele separate vor fi transferate pe membrane de nitroceluloză, blocate și sondate cu anticorpii monoclonali testați. Legarea IgG poate fi detectată folosind peroxidază IgG anti-șoarece și dezvoltată cu substrat ECL.

Anticorpii pot fi testați în continuare cu privire la reactivitatea cu antigen prin imunohistochimie într-o manieră bine cunoscută persoanelor cu competențe în domeniu, de ex. folosind criosecțiuni fixate în paraformaldehidă sau acetonă sau secțiuni de țesut încorporate în parafină, fixate cu paraformaldehidă, din probe de țesut necanceros sau țesut canceros prelevate de la pacienți în timpul procedurilor chirurgicale de rutină sau de la șoareci prezentând tumori xenogrefate inoculate cu linii celulare care exprimă antigenul spontan sau după transfecție. Pentru imunocolorare, anticorpii reactivi la antigen pot fi incubati, urmați de anticorpi de capră anti-șoarece sau de capră anti-iepura conjugati cu peroxidază de hrean (DAKO), în conformitate cu instrucțiunile furnizorului.

Conjugații de anticorpi care se leagă de CLDN18.2 pot fi de asemenea testați într-un model in vivo (de ex. la șoareci cu deficiență imunitară purtători de tumori xenogrefate inoculați cu linii celulare care exprimă CLDN18.2, de ex. DAN-G, SNU-16 sau KATO-III sau după transfecție, de ex. HEK293) pentru a le determina eficiența în controlul creșterii celulelor tumorale care exprimă CLDN18.2.

Conjugații de anticorpi pot fi administrați șoarecilor fără tumori, după care se injectează celulele tumorale pentru a măsura efectele conjugațiilor de anticorpi pentru a preveni formarea tumorilor sau simptomelor legate de tumori. Conjugații de anticorpi pot fi administrați șoarecilor purtători de tumori pentru a determina eficiența terapeutică a respectivilor conjugați de anticorpi în reducerea creșterii tumorale, metastazelor sau simptomele asociate cu tumori. Aplicarea conjugațiilor de anticorpi poate fi combinată cu aplicarea altor substanțe precum medicamente cistostatice, inhibitori ai factorului de creștere, blocante ale ciclului celular, inhibitori ai angiogenezei sau alți anticorpi pentru a determina eficiența sinergetică și toxicitatea potențială a combinațiilor. Pentru a analiza efectele secundare toxice mediate de conjugații de anticorpi, animalele pot fi inoculate cu conjugați de anticorpi sau reactivi de control și investigate amănunțit cu privire la simptome posibil legate de terapia cu conjugați de anticorpi CLDN18.2. Efectele secundare posibile ale aplicării in vivo a conjugațiilor de anticorpi CLDN18.2 includ în special toxicitatea la țesuturile care exprimă CLDN18.2, inclusiv stomacul.

Reprezentarea epitopilor recunoscuți de anticorpi poate fi efectuată așa cum se descrie detaliat în "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology), Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 și în "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248, Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

Compușii și agenții descriși în prezenta se pot administra sub formă de orice compoziție farmaceutică adecvată.

Compozițiile farmaceutice din invenție sunt de preferință sterile și conțin o cantitate eficientă de conjugați de anticorpi descriși în prezenta și opțional de alți agenți discutați aici pentru a genera reacția dorită sau efectul dorit.

Compozițiile farmaceutice sunt prevăzute de obicei într-o formă de dozaj uniform și pot fi preparate într-o manieră cunoscută. O compoziție farmaceutică poate fi de ex. sub formă de soluție sau suspensie.

O compoziție farmaceutică poate conține săruri, soluții tampon, conservanți, vehicule, solvenți și/sau excipienți acceptabili farmaceutic. Termenul "acceptabil farmaceutic" se referă la netoxicitatea unui material care nu interacționează cu acțiunea componentei active a compoziției farmaceutice.

Sărurile care nu sunt acceptabile farmaceutic se pot folosi în prepararea sărurilor acceptabile farmaceutic și sunt incluse în invenție. Sărurile acceptabile farmaceutic de acest tip le includ, nelimitativ, pe cele preparate din următorii acizi: clorhidric, bromhidric, sulfuric, nitric, fosforic, maleic, acetic, salicilic, citric, formic, malonic, succinic etc.. Sărurile acceptabile farmaceutic pot fi preparate de asemenea ca săruri de metale alcaline sau săruri de metale alcalino-pământoase, cum ar fi săruri de sodiu, potasiu sau calciu.

Substanțele tampon adecvate utilizării într-o compoziție farmaceutică includ acid acetic într-o sare, acid citric într-o sare, acid boric într-o sare și acid fosforic într-o sare.

Conservanții adecvați utilizării într-o compoziție farmaceutică includ clorură de benzalconiu, clorobutanol, paraben și thimerosal.

O formă injectabilă poate conține un excipient acceptabil farmaceutic, cum ar fi soluție Ringer Lactat.

Termenul "vehicul" se referă la o componentă organică sau anorganică, naturală sau sintetică, în care componenta activă este combinată pentru a facilita, mări sau permite aplicarea. Conform invenției, termenul "vehicul" include și unul sau mai mulți agenți de umplere solizi sau lichizi compatibili, solvenți sau substanțe de încapsulare, adecvate administrării unui pacient.

Vehiculele posibile pentru administrare parenterală sunt de ex. apă sterilă, Ringer, Ringer lactat, soluție sterilă de clorură de sodiu, polialchilenglicoli, naftalene hidrogenate și, în mod specific, polimeri lactid biocompatibili, copolimeri lactid/glicolid sau copolimeri polioxietilen/polioxipropilen.

Termenul "excipient", folosit în prezenta, indică toate substanțele care pot fi prezente într-o compoziție farmaceutică și care nu sunt ingrediente active cum ar fi, de ex., vehicule, lianți, lubrifianți, agenți de îngroșare, surfactanți, conservanți, emulgatori, soluții tampon, aromatizanti sau coloranți.

Agenții și compozițiile descrise în prezenta se pot administra prin orice cale convențională, cum ar fi prin administrare parenterală, inclusiv prin injecție sau perfuzie. Administrarea este de preferință parenterală, de ex. intravenoasă, intraarterială, subcutanată, intradermică sau intramusculară.

Compozițiile adecvate pentru administrare parenterală conțin de obicei un preparat apos sau neapos steril de compus activ, care este de preferință izotonic cu sângele primitivului. Exemplele de

vehicule și solvenți compatibili sunt soluție Ringer și soluție izotonică de clorură de sodiu. În plus, se folosesc uleiuri nevolatili, de obicei sterile, ca mediu de soluție sau suspensie.

Agenții și compozițiile descrise în prezenta se administrează în cantități eficiente. O "cantitate eficientă" se referă la cantitatea care determină o reacție dorită sau un efect dorit, individual sau împreună cu alte doze. În cazul tratamentului unei anumite boli sau unei anumite afecțiuni, reacția dorită se referă de preferință la inhibarea cursului bolii. Aceasta cuprinde încetinirea progresului bolii și, în mod specific, întreruperea sau inversarea progresului bolii. Reacția dorită într-un tratament al unei boli sau afecțiuni poate fi de asemenea întârzierea declanșării sau prevenirea declanșării bolii sau afecțiunii respective.

O cantitate eficientă a unui agent sau a unei compoziții descrise în prezenta va depinde de afecțiunea tratată, gravitatea bolii, parametrii individuali ai pacientului, inclusiv vârsta, starea fiziologică, dimensiunile și greutatea, durata tratamentului, tipul unei terapii însoțitoare (dacă este prezentă), calea specifică de administrare și factori similari. În consecință, dozele administrate de agenți descriși în prezenta pot depinde de astfel de parametri diferiți. În cazul în care o reacție a unui pacient este insuficientă cu o doză inițială, se pot utiliza doze mai mari (sau doze mai mari administrate pe o cale de administrare diferită, mai localizată).

Agenții și compozițiile prevăzute în prezenta se pot folosi individual sau în combinație cu regimuri terapeutice convenționale cum ar fi chirurgie, radiații, chimioterapie și/sau transplant de măduvă osoasă (autolog, singenic, alogenic sau neînredit).

Tratamentul cancerului reprezintă un domeniu în care sunt dezirabile în mod special strategii combinate deoarece, în mod frecvent, acțiunea combinată a două, trei, patru sau chiar mai multe medicamente/terapii pentru cancer generează efecte sinergetice considerabil mai puternice decât impactul unei metode monoterapeutice. Astfel, într-o altă aplicare a prezentei invenții, un tratament al cancerului poate fi combinat eficient cu diferite alte medicamente. Printre acestea sunt de ex. combinații cu terapii convenționale, strategii cu epitopi multipli, imunoterapie suplimentară și metode de tratament care vizează angiogeneza sau apoptoza (vezi de ex. Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11): 1735-1743.) Administrarea succesivă a diferiților agenți poate inhiba creșterea celulelor canceroase la diferite puncte de control, iar alți agenți pot inhiba de ex. neo-angiogeneza, supraviețuirea celulelor maligne sau metastazelor, posibil transformând cancerul într-o boală cronică.

Agenții și compozițiile descrise în prezenta pot fi administrate pacienților, de ex., in vivo, pentru a trata sau preveni o varietate de tulburări precum cele descrise în prezenta. Pacienții preferați includ pacienți umani care prezintă tulburări care pot fi corectate sau ameliorate prin administrarea agenților și compozițiilor descrise în prezenta. Acestea includ tulburări care implică celule caracterizate printr-un tipar de expresie modificat al CLDN18.2.

De exemplu, într-o aplicare, agenții și compozițiile descrise în prezenta se pot utiliza pentru a trata un pacient cu o boală canceroasă, de ex., o boală canceroasă descrisă în prezenta, caracterizată prin prezența celulelor canceroase care exprimă CLDN18.2.

Compozițiile farmaceutice și metodele de tratament descrise conform invenției pot fi de asemenea utilizate pentru imunizare sau vaccinare pentru a preveni o boală descrisă în prezenta.

Prezenta invenție este ilustrată în continuare prin următoarele exemple care nu limitează domeniul de aplicare al invenției.

EXEMPLE

EXEMPLUL 1: MATERIALE ȘI METODE

1. Endocitoză

Endocitoza IMAB362 legat de CLDN18.2 s-a determinat folosind un test de endocitoză pe baza citotoxicității care se bazează pe co-internalizarea anticorpului legat de țintă și un fragment Fab al IgG anti-uman sau anti-șoarece conjugat cu saporină (Fab-ZAP uman, Advanced Targeting Systems, IT-51, Lot: #93-23; Fab-ZAP șoarece, Advanced Targeting Systems, IT-48, Lot: #93-21). Saporina este o proteină de inactivare ribozomală care, la internalizare, inhibă biosinteza proteinelor și așadar duce la moartea celulelor. Pentru a garanta liza celulară optimă, anticorpul Fab-ZAP s-a aplicat în molaritate de cel puțin 6 ori comparativ cu anticorpul țintă.

Celulele HEK293~CLDN18.2 transfectate stabil au fost recoltate cu 0.05% tripsină/EDTA (Gibco, 25300-054) și 2.5×10^3 celule/godeu s-au însămânțat în 50 μ l mediu de creștere într-o placă de cultură celulară cu 96 de godeuri. După 24 h, în celule s-au adăugat 25 μ l de Fab-ZAP și 25 μ l de mAB anti-CLDN18.2 sau anticorp de control izotip diluat în mediu de cultură celulară (Tabel 1). Celulele au fost cultivate alte 72 h.

Tabel 1: Concentrații mAB anti-CLDN18.2 și Fab-ZAP pentru testul endocitozei.

Greutate moleculară: ~150 kDa pentru IMAB362 și 110 kDa pentru FabZAP.

Diluare	Concentrație finală [ng/ml]	
	anti-CLDN18.2	Fab-ZAP
D1	187.5	825
D2	75.0	825
D3	30.0	825
D4	12.0	825
05	4.800	825
D6	1.920	825
D7	0.768	825
D8	0.307	825
09	0.123	825

Viabilitatea celulară s-a analizat așa cum se descrie la 6. Celulele incubate fără anticorpi în prezența Fab-ZAP s-au folosit cu rol de control.

2. Cartarea epitopilor

Epitopul antigenic responsabil de specificitatea CLDN18.2 s-a analizat prin citometrie în flux (vezi 5) pe celule HEK293T care supraexprimă temporar mutanți CLDN18.2. S-au generat în total opt mutanți CLDN18.2 cu substituții aminoacidice individuale în primul domeniu extracelular prin PCR. Așadar, aminoacizii CLDN18.2 au fost substituiți cu aminoacizi ai proteinei omoloage CLDN18.1 la pozițiile corespunzătoare. Celulele HEK293T au fost co-transfectate cu plasmide care codifică un mutant CLDN18.2 specific și EGFP ca genă reporter. Anticorpii purificați au fost testați la o concentrație de 5 μg/ml, în timp ce anticorpii derivați din supernatanți de hibridom s-au diluat la 1:4 înaintea testării. Pentru a determina dacă legarea anticorpului a fost influențată de o substituție aminoacidică specifică, intensitatea medie a fluorescenței (MFI) măsurată în populația de celule transfectate (EGFP pozitive) s-a comparat între un mutant care prezintă cea mai mare valoare MFI și mutantul de interes. Dacă MFI a mutantului de interes a fost sub 50%, reziduul aminoacidic a fost caracterizat ca fiind esențial pentru legarea anticorpului și specificitatea CLDN18.2.

3. Conjugări anticorp medicament

Conjugările DM4 și vcMMAE cu anticorpus monoclonal IMAB362 (lot # p412118) și caracterizarea analitică s-au efectuat la Piramal Healthcare (Grangemouth, UK). Metodele sunt descrise pe scurt în secțiunea următoare:

DM4 s-a cuplat cu IMAB362 prin SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirat). Reactivul SPDB este un linker încrucișat de proteină heterobifuncțională reactivă cu amino și sulfhidril care reacționează printr-un ester N-hidroxisuccinimidă (NHS) cu amine primare (care se găsesc în catenele laterale de lizină sau capătul N al proteinelor) ale anticorpului și printr-o grupă piridinildisulfidă cu grupa sulfhidril a DM4 pentru a produce o legătură disulfurică reversibilă (Figura 1). Pe scurt, pentru conjugarea DM4, IMAB362 a fost diafiltrat în tampon PBS (pH 7.2) folosind un filtru ultra centrifug și cuplat cu SPDB la un raport molar de 1:6 (IMAB362:SPDB) 1 h la TC. Anticorpus modificat a fost dializat cu 35 mM tampon citrat (pH 5.5) și s-a determinat raportul linker - anticorp. DM4 s-a conjugat cu IMAB362-SPDB la un raport molar de 1:6 (IMAB362-SPDB:DM4) 19 h la 2-8°C. Anticorpus conjugat a fost ajustat la tamponul de depozitare (20 mM His, 85 mg/ml sucroză, pH 5.8) și depozitat la -80°C. Raportul dintre medicament și anticorp a fost analizat prin spectrometrie UV, conținutul de monomer prin SEC-HPLC și conținutul de medicament liber prin RP-HPLC.

vcMMAE s-a cuplat cu IMAB362 tiolat. Așadar, IMAB362 a fost inițial tiolat cu linkerul heterobifuncțional 2-IT (2-iminotiolan) care reacționează cu aminele libere ale reziduurilor de lizină. Apoi, vcMMAE, conținând linkerul peptidic clivabil de catepsină Val-Cit (vc), a fost conjugat prin valină cu grupa sulfhidril a anticorpului tiolat (Figura 1). Pe scurt, IMAB362 a fost diafiltrat în tampon PBS (pH 7.2) folosind un filtru ultra centrifug și incubat cu 2-IT la un raport molar de 1:20 (IMAB362:2-IT) 2 h la TC. Anticorpus modificat a fost dializat în 35 mM tampon citrat (pH 5.5) și s-a determinat raportul linker - anticorp. Apoi, vcMMAE a fost conjugat cu IMAB362 tiolat la un raport molar de 1:6 (IMAB362-SH:vcMMAE) prin incubare 20 h la 2-8°C. Anticorpii conjugați au fost dializați în tampon de depozitare (20 mM His, 85 mg/mL sucroză, pH 5.8) și depozitați la -80°C. Raportul medicament - anticorp a fost

analizat prin spectrometrie UV, conținutul de monomer prin SEC-HPLC și conținutul de medicament liber prin RP-HPLC.

4. Cultură celulară

- 5 Liniile celulare au fost cultivate conform instrucțiunilor furnizorului și fișelor de date ale liniei celulare Ganymed în mediu specific tipului de celule la 37°C în incubatoare umidificate cu 5% sau 7.5% CO₂ (Tabel 2). Mediile de cultură celulară și suplimentele s-au obținut de la Invitrogen, Gibco și Sigma.

Tabel 2: Sisteme de modele celulare.

Linie celulară	Specie/țesut/boală	Mediu	Incubare
HEK293~simulare	renale embrionare umane	DMEM/F12 (10% FCS, 1% pen/strep, 1,5mg/ml geneticin)	7.5 % CO ₂ , 37°C
HEK293~CLDN18.2	renale embrionare umane (transfectate stabil cu CLDN18.2 umană)	DMEM/F12 (10% FCS, 1% pen/strep, 1,5mg/ml geneticin)	7.5 % CO ₂ , 37°C
HEK293~CLDN18.1	renale embrionare umane (transfectate stabil cu CLDN18.1 umană)	DMEM/F12 (10% FCS, 1% pen/strep, 1,5mg/ml geneticin)	7.5 % CO ₂ , 37°C
BxPC-3	adenocarcinom pancreatic uman	RPMI (10 mM HEPES, 1 mM sodiu piruvat, 4,5 g/l glucoză, 10% FCS)	5% CO ₂ , 37°C
BxPC-3~CLDN18.2	adenocarcinom pancreatic uman (transduse stabil cu CLDN18.2 umană)	RPMI (10 mM HEPES, 1 mM sodiu piruvat, 4,5 g/l glucoză, 1× sodiu bicarbonat, 10% FCS, 0.5 µg/ml blasticidin)	5% CO ₂ , 37°C
NCI-N87	carcinom gastric uman	RPMI (10 mM HEPES, 1 mM sodiu piruvat, 4,5 g/l glucoză, 10% FCS)	5% CO ₂ , 37°C
NCI-N87~CLDN18.2	carcinom gastric uman (transduse stabil cu CLDN18.2 umană)	RPMI (10mM HEPES + 1 mM sodiu piruvat, 4,5 g/l glucoză, 10% FCS, 1.5 µg/ml blasticidin)	5% CO ₂ , 37°C
DAN-G 1C5F2	adenocarcinom pancreatic uman	RPMI (10% FCS, 1% pen/strep)	5% CO ₂ , 37°C
NUGC-4 10cF7-5 sort 3a	adenocarcinom gastric uman	RPMI (10% FCS, 1% pen/strep)	5% CO ₂ , 37°C
NUGC-4 10cE8	adenocarcinom pancreatic uman	RPMI (10% FCS, 1% pen/strep)	5% CO ₂ , 37°C
PA-1(Luc)	teratocarcinom ovarian uman	EMEM (1mM sodiu piruvat, 0,1 mM NEAA; 1,5g/l sodiu bicarbonat, 10% FCS)	5% CO ₂ , 37°C

5. Citometrie în flux

- 10 Afinitățile și specificitățile de legare relative ale anticorpilor anti-CLDN18.2 simpli și ale conjugatilor anticorp-medicaament s-au determinat prin citometrie în flux folosind linii celulare pozitive și negative la CLDN18.2.

- 15 Celulele dintr-o cultură cu creștere exponențială s-au recoltat cu 0.05% tripsină/EDTA (Gibco, 25300-054) și s-au numărat folosind o cameră de numărare Neubauer. Celulele au fost centrifugate 5 min la 1500 rpm (468 × g), supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost resuspendate în tampon FACS (PBS conținând 2% FCS (Gibco, 10270-106) pentru analiză cu anticorpi conjugați cu toxină, PBS conținând 2% FCS și 2 mM EDTA pentru selecția anticorpilor CLDN18.2 simpli reactivi) la 2 × 10⁶ celule/ml. S-au transferat 100 µl de suspensie celulară per godeu (corespunând unui număr de 2 × 10⁵ celule/godeu) într-o placă de microtitru cu 96 de godeuri cu fund rotund. După centrifugare 1 min la 1500 rpm, supernatantul a fost îndepărtat și celulele au fost resuspendate în tampon FACS conținând anticorpi conjugați cu toxină sau simpli la concentrații adecvate (până la 20 µg/ml pentru măsurarea afinității
- 20

relative sau 50 µg/ml pentru controlul expresiei) și incubate 30-45 min la 4°C (Tabel 3). Celulele au fost centrifugate 1 min la 1500 rpm și supernatantul s-a îndepărtat. După ce celulele au fost spălate de trei ori cu tampon FACS, s-au resuspendat în tampon FACS conținând IgG anti-uman conjugat cu APC (Jackson Immuno Research, 109-136-170) sau IgG de capră-anti-șoarece conjugat cu APC (Jackson Immuno Research, 115-136-146) sau Protein L-FITC (1 µg/ml, analiza chim mAB294) și s-au incubat 30 min la 4°C (Tabel 3). După incubare, s-au adăugat 100 µl tampon FACS în fiecare probă, celulele au fost centrifugate 1 min la 1500 rpm și supernatantul s-a îndepărtat. Etapa de spălare cu tampon FACS s-a repetat de două ori. În sfârșit, celulele au fost resuspendate în 100 µl tampon FACS și legarea s-a determinat folosind un BD FACS Array Bioanalyzer.

Se menționează că anticorpii conjugați cu toxină și simpli s-au aplicat la concentrații egale. Diferențele dintre greutatea moleculară a anticorpilor au fost neglijate.

Tabel 3: Detalii experimentale ale citometriei în flux.

Analiză	Anticorp primar	Anticorp secundar
Compararea IMAB362 cu IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE	-100 µl	- 50 µl
	- 0.1, 0.3, 0.9, 3.1, 10.9, 38.1 133.3, 466.5, 1632.7, 5714.3, 20000 ng/ml	- diluare 1:200
	-45 min 4°C	- 30 min
Compararea IMAB362 cu anticorpi reactivi CLDN18.2 murini sau himerici	- 50 µl	- 30 µl
	- 19.5, 39.1, 78.1, 156.3, 312.6, 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 ng/ml	- diluare 1:100
	- 30 min 4°C	- 30 min
Compararea IMAB362 cu chim mAB294	- 50 µl	- 50 µl
	- 19.5, 39.1, 78.1, 156.3, 312.6, 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 ng/ml	- 1 µg/ml
	- 30 min 4°C	- 30 min

6. Test de viabilitate

Efectul IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE asupra viabilității celulare s-a determinat folosind un test colorimetric care detectează activitățile metabolice celulare. Testul se bazează pe capacitatea celulelor metabolic active pentru a reduce XTT galben (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazoliu-5-carboxanilidă) într-un compus formazan colorat portocaliu care poate fi detectat prin spectrofotometrie. Intensitatea colorantului este proporțională cu numărul celulelor vii.

Celulele au fost recoltate cu 0.05% tripsină/EDTA (Gibco, 25300-054), resuspendate în mediu de cultură celulară (Tabel 2) și 50 µl din suspenzia celulară cu cantitatea corespunzătoare de celule s-au însămânțat per godeu în plăci de cultură cu 96 de godeuri (Tabel 4). După 24 h, s-au adăugat IMAB362 conjugat cu toxină sau anticorpii de control diluați în 50 µl de mediu la concentrațiile corespunzătoare și celulele au fost cultivate încă 72 h.

Tabel 4: Prezentarea liniilor celulare folosite în teste de viabilitate.

Linie celulară	Număr de celule per godeu 96
NCI-N87~CLDN18.2	6000
NCI-N87	6000
NUGC-4 10cE8	3000
NUGC-4 10cF7-5 sort3a	3000
BxPC-3~CLDN 18.2	3000

Linie celulară	Număr de celule per godeu 96
HEK293~CLDN18.2	2000
HEK293~CLDN18.1	2000
HEK293(CLDN6)	2000

Viabilitatea celulelor s-a analizat folosind kitul de proliferare celulară AppliChem II (AppliChem, A8088, 1000) conform instrucțiunilor producătorului. După incubare 3-5 h cu reactiv XTT, s-a măsurat absorbanta la 480 nm (referință 630 nm) folosind un spectrofotometru (Tecan). Reducerea viabilității s-a calculat folosind următoarea ecuație:

$$\text{Reducerea viabilității } [\%] = 100 - \left[\frac{\text{sample} - \text{blank}}{\text{control} - \text{blank}} * 100 \right]$$

blank (martor): control mediu

control: celule fără anticorp

sample (probă): celule cu anticorp

Valorile EC50 s-au determinat cu GraphPad Prism 6 folosind regresia neliniară.

7. Test martor

Activitatea martor a anticorpilor IMAB362 conjugați cu toxină asupra celulelor țintă negative a fost analizată *in vitro* prin co-cultivarea liniei celulare care exprimă luciferază, negativă la CLDN18.2, PA-1(Luc) în prezența sau absența liniei pozitive la CLDN18.2 NUGC-4 10cE8. Prin urmare, s-au înșămânțat 1.5×10^3 celule PA-1(Luc) per godeu pentru cultura individuală sau împreună cu 1.5×10^3 celule NUGC-4 10cE8 per godeu pentru co-cultură în mediu RPMI suplimentat cu 10% FCS și 1% pen/strep. După 24 h, s-au adăugat IMAB362-DM4, IMAB362-vcMMAE sau IMAB362 neconjugat ca un control negativ și celulele au fost cultivate alte 72 h. Viabilitatea celulară s-a analizat așa cum se descrie la 6. Liza celulelor țintă negative s-a determinat măsurând bioluminescența celulelor care exprimă luciferază PA-1(Luc). Așadar, s-au adăugat 50 μ l amestec de luciferină (1.92 mg/ml D-luciferină (Sigma, 50227) și 160 mM HEPES în ddH₂O) per godeu. Placa a fost incubată în întuneric la TC 90 min și bioluminescența s-a măsurat folosind un luminometru (Infinite M200, TECAN). Rezultatele sunt exprimate ca unități luminoase relative (RLU) digitale integrate. Reducerea viabilității a fost calculată așa cum se descrie la 6.

8. Experimente pe animale

Toate studiile cu xenogrefe s-au efectuat conform reglementărilor naționale și îndrumărilor etice pentru studii experimentale pe animale. Toate animalele au fost ținute în condiții fără patogeni specifice în cuști individuale ventilate și într-un ciclu de 12 h de lumină artificială - întuneric. Măncarea și apa s-au furnizat ad libitum. Înaintea începutului studiilor, șoarecii au fost lăsați să se aclimatizeze minim 6 zile.

8.1. Studiul dozei maxime tolerate (MTD)

Tumorile de xenogrefă s-au inoculat prin injecția subcutanată a 8.5×10^6 celule tumorale pancreatice umane BxPC-3~CLDN18.2 în 200 μ l PBS la șoareci Hsd:atimici fără păr-Foxnlnu femele. Pentru a determina MTD și eficiența conjugatilor anticorp anti-CLDN18.2-medicament, șoarecii purtători de tumori au primit doze diferite de IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE. Doza maximă aplicabilă a fost limitată de concentrația anticorpului și volumul de injecție recomandat de GV-SOLAS pentru injecție intravenoasă la șoareci (~200 μ l). Ambii anticorpi s-au aplicat în concentrația maximă ca doză individuală și repetată (i.e. 15 și 16 mg/kg), precum și la jumătate din această concentrație (i.e. 7.5 și 8 mg/kg) sau control vehicul (mărime grup: n=5). Anticorpii au fost injectați intravenos în ziua 14 post grefă și suplimentar pentru doza repetată în ziua 21 post grefă. Greutatea corporală, starea de sănătate a animalelor, comportamentul și dimensiunea tumorală s-au monitorizat de două ori pe săptămână cu un șubler și volumele tumorale s-au calculat conform formulei următoare: [lungime $\times$ lățime $\times$ (lățime/2)]. Toate animalele au fost disecate când prima tumoare din grupul cu vehicul a atins maxim 1400 mm³ sau când tumoarea a devenit ulcerosă (ziua 49 post grefă pentru IMAB362-DM4, ziua 37 post grefă pentru IMAB362-vcMMAE). Probele de sânge pentru analiza chimică clinică s-au colectat sub anestezie generală inițiată cu 250 μ l i.p. dintr-un amestec constând din 1.25 ml ketamină, 1 ml xilazină (2%) și 7.75 ml H₂O. Șoarecii au primit apoi perfuzii cu PBS, urmat de 4% formalină sub anestezie generală. Organele și țesuturile selectate (stomac, esofag, creier, inimă, rinichi, ficat, plămân, pancreas, splină, duoden, ileon, colon, uter și ovar) au fost disecate și fixate în 4% formalină, depozitate la 4°C și în sfârșit încorporate în parafină. S-au tăiat secțiuni tisulare de trei micrometri din fiecare probă FFPE (fixată în formalină,

încorporată în parafină) și s-au montat pe lamele adezive (SuperFrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific). După tratare termică 60 min la 58°C, secțiunile de țesut FFPE au fost deparafinizate cu xilen și rehidratate printr-o serie treptată de etanol (2x 100%, 2x 96%, 2x 70% etanol câte 3 min). Nucleii s-au colorat 5 min la TC cu hematoxilină Mayer, după care s-au albăstrit în H₂O. Apoi citoplasma a fost contracolorată cu 0.5% eozină apoasă 2 min la TC. După deshidratare printr-o serie treptată de etanol și secțiunile cu xilen s-au montat folosind mediul de montare neapos X-TRA Kit.

8.2. Biochimie clinică

Pentru a testa posibila toxicitate a organelor, markerii relevanți pentru toxicitatea pancreatică, nefronică și hepatică s-au analizat în probe serice.

Nivelurile de alanin aminotransferază/transaminază glutamică-piruvică (GPT), aspartat aminotransferază/transaminaza glutamică-oxaloacetică (GOT), gamma-glutamyltransferază (gamma-GT), fosfatază alcalină (AP), glutamat dehidrogenază (GLDH), creatinină, creatinin kinază (CK), uree, colinesterază, bilirubină, lipază, alpha-amilază, lactat dehidrogenază (LDH), albumină și proteină totală s-au determinat la Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität (Mainz, Germania). Probele serice s-au preparat din sânge obținut după sângerarea finală. Sângele a fost colectat prin puncție retrobulbară după anestezierea șoarecilor cu ketamină/xilazină.

8.3. Studii de eficiență

Pentru constituirea tumorilor de xenogrefă umane, s-a suspendat un număr corespunzător de celule într-un volum de 200 μ l PBS, care s-au injectat subcutanat în șoareci Hsd:atimici fără păr-Foxnlnu femele. Șoarecii purtători de tumori au fost tratați cu o singură injecție intravenoasă de IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE la doze care nu depășesc MTD. Anticorpul simplu de control s-a administrat de două ori pe săptămână alternând injecțiile IV/i.p. de ~8 mg/kg IMAB362. În studiile de tratament timpuriu, tratamentul a început la 3 zile post grefă. În studiile de tratament avansat, tumorile au crescut la un volum între 50 și 200 mm³ și șoarecii au fost redistribuiți în grupuri de control și anticorp cu volume medii tumorale omogene înaintea tratamentului. Greutatea corporală, starea de sănătate a animalelor, comportamentul și dimensiunea tumorală s-au monitorizat de două ori pe săptămână cu un șubler. Volumele tumorale s-au calculat conform formulei următoare: [lungime $\times$ lățime $\times$ (lățime/2)]. Un criteriu de oprire a fost o dimensiune tumorală cu lungime sau lățime >16 mm sau cu un volum calculat > 1400 mm³. Alte criterii de oprire au fost tumori ulcerante sau o pierdere de peste 10% greutate corporală. În cazul inhibării complete a creșterii tumorale, șoarecii au fost observați 120 de zile după tratament. Tumorile persistente au fost procesate și fixate în 4% formalină pentru studii IHC ulterioare.

9. Citotoxicitate celulară dependentă de anticorp (ADCC)

Citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC) s-a determinat măsurând conținutul de ATP intracelular în celule nelizate după adăugarea PBMC umane în celulele țintă în prezența conjugatilor cu toxină IMAB362. Bioluminescența generată de luciferază s-a folosit pentru cuantificarea ATP.

Celulele țintă NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 au fost însămânțate cu numere definite de celule (8×10^6 celule) cu două zile înaintea testului pentru a obține confluențe reproductibile.

Celulele țintă au fost recoltate cu 0.05% tripsină/EDTA (Gibco, 25300-054) și ajustate la o concentrație de 1.6×10^5 celule/ml în mediu de creștere conținând 20 mM HEPES (Gibco, 15630-056). S-au însămânțat 8×10^3 celule per godeu într-o placă PP albă cu 96 de godeuri și s-au incubat ~5 h la 37°C și 5% CO₂.

PBMC s-au preparat din supernanțanți leuco-trombocitari proaspeți obținuți de la donatori sănătoși. S-au diluat aproximativ 20-25 ml de sânge (1:2) cu PBS în 3 tuburi Falcon și stratificate cu grijă pe 15 ml Ficol-Paque Plus (GE Healthcare, 17144003) în patru tuburi Falcon de 50 ml. Gradienții s-au centrifugat (25 min, 700 $\times$ g). După centrifugare PBMC s-au colectat din interfază, s-au spălat în 50 ml PBS/2mM EDTA, s-au centrifugat (5 min, 468 $\times$ g), s-au resuspendat în 50 ml PBS/2mM EDTA și s-au centrifugat din nou (10min, 208 $\times$ g) pentru îndepărtarea trombocitelor. Peletele s-au resuspendat în 50 ml PBS/2 mM EDTA și s-au numărat celulele. Apoi, PBMC au fost centrifugate (5 min, 468 $\times$ g), resuspendate în mediu de cultură X-Vivo-15 (Lonza, BE04-418Q) conținând 5% ser uman și cultivate 1.5 h la 37°C, 5% CO₂. PBMC au fost recoltate, centrifugate (5 min, 468xg) și resuspendate în mediu de cultură X-Vivo-15 (Lonza, BE04-418Q) ajustând concentrația celulelor (pentru un raport E:T de 40:1) la 1.28×10^7 celule/ml. IMAB362-DM4, IMAB362-vcMMAE și IMAB362 s-au diluat în serie (etape de diluare 4.5x) de 11 ori, rezultând un interval al concentrației între 160 μ g/ml și 0.05 ng/ml (concentrație finală de 40 μ g/ml până la 0.01 ng/ml). S-au adăugat câte 25 μ l din fiecare diluție în celulele țintă și pentru fiecare condiție s-au folosit patru reproduceri. S-a adăugat PBS fără anticorpi în godeuri de control de liză medie și totală. Apoi, s-au adăugat 25 μ l din PBMC preparate (3.2×10^5 celule) în fiecare godeu pentru a obține un raport E:T de 40:1 și plăcile au fost incubate 15h $\pm$ 1h la 37°C, 5% CO₂. După incubare peste noapte, s-au adăugat 10 μ l de soluție 8% Triton X-100/PBS în godeurile de control de liză maximă și 10 μ l PBS în celelalte godeuri. În sfârșit, s-au adăugat 50 μ l din soluția-mamă de luciferină proaspăt

preparată (160 mM HEPES, 1x PBS, 3.84 mg/ml D-Luciferină (Sigma Aldrich, 50227)) în fiecare godeu și plăcile au fost incubate 90 min la TC în întuneric. Bioluminescența s-a măsurat folosind un luminometru (Infinite M200, TECAN). Rezultatele sunt exprimate ca unități luminoase relative (RLU) digitale integrate.

5 Liza specifică se calculează după cum urmează:

$$\text{liza specifică [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{probă} - \text{liza totală})}{(\text{celule viabile max.} - \text{liza totală})} \times 100 \right]$$

10 (celule viabile max: 10 μl PBS, fără anticorp; liză totală: 10 μl 8% (v/v) Triton X-100 în PBS, fără anticorp)

Toate datele ADCC au fost procesate cu GraphPad Prism 6 folosind funcția "log(agonist) vs răspuns - determinare EC". Liza maximă s-a definit ca distanța (diferența de la sus la jos) curbei răspunsului la doză, dar maxim 100%.

15 10. Citotoxicitate dependentă de complement (CDC)

Citotoxicitatea dependentă de complement (CDC) s-a determinat măsurând conținutul de ATP intracelular în celule nelizate după adăugarea complementului uman în celulele țintă în prezența conjugatilor cu toxină IMAB362. S-a măsurat bioluminescența dependentă de ATP generată de luciferază.

20 Celulele țintă NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 sau KATO-III FGF-BP#12 adM p3151#25 au fost înșămânțate cu numărul de celule definit (8×10^6 și 9×10^6 celule) cu două zile înaintea testului pentru a obține confluențe reproductibile.

25 Celulele țintă au fost recoltate cu 0.05% tripsină/EDTA și ajustate la o concentrație de 1.6×10^5 celule/ml în mediul de cultură conținând 10% (v/v) FCS. 8×10^3 celule s-au înșămânțat într-o placă albă cu 96 de godeuri și s-au incubat la 37°C și 5% CO₂. După 24 h, s-au adăugat 50 μl de anticorpi diluați în serie în mediu de testare (60% RPMI, conținând 20 mM HEPES; 40% ser uman, recoltat de la donatori sănătoși) (concentrație finală 80 μg/ml până la 78.13 ng/ml) și celulele au fost incubate 80 min la 37°C și 5% CO₂. Apoi, 10 μl 8% (v/v) Triton X-100 în PBS s-au adăugat în controlul de liză totală și s-au adăugat 10 μl PBS în toate celelalte godeuri (control celule viabile max și probele efective). Reacția luciferazei a început adăugând 50 μl de amestec de luciferină (3.84 mg/ml D-luciferină, 160 mM HEPES în ddH₂O) per godeu. Placa s-a păstrat în întuneric la TC 90 min și bioluminescența s-a măsurat folosind un luminometru (Infinite M200, TECAN). Rezultatele sunt exprimate ca unități luminoase relative (RLU) digitale integrate.

35 Liza specifică se calculează după cum urmează:

$$\text{liza specifică [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{probă} - \text{liza totală})}{(\text{celule viabile max.} - \text{liza totală})} * 100 \right]$$

40 (celule viabile max: 10 μl PBS, fără anticorp; liză totală: 10 μl 8% (v/v) Triton X-100 în PBS, fără anticorp)

Toate datele CDC au fost procesate cu GraphPad Prism 6 folosind funcția "log(agonist) vs răspuns - determinare EC". Liza maximă s-a definit ca distanța (diferența de la sus la jos) curbei răspunsului la doză, dar maxim 100%.

45 **EXEMPLUL 2: SELECTIA PRIN ENDOCITOZĂ A ANTICORPILOR ANTI-CLDN18.2 SPECIFICI**

50 În timp ce în terapia anti-tumorală cu anticorpi simpli, internalizarea anticorpilor legați de țintă poate reduce numărul anticorpilor legați de membrană accesibili pentru modurile de acțiune majore, de ex. ADCC și CDC, endocitoza este o caracteristică esențială pentru dezvoltarea conjugatilor anticorp-medicament (ADC). O proprietate importantă a ADC este endocitoza complexului țintă-ADC. Așadar, rata de endocitoză a anticorpului simplu este unul dintre factorii esențiali pentru dezvoltarea anticorpilor conjugati cu toxină.

55 Proprietățile de legare, i.e. afinitatea relativă față de CLDN18.2, reactivitatea încrucișată cu CLDN18.1 și epitopul antigenic care mediază specificitatea CLDN18.2, s-au determinat pentru diferiți anticorpi anti-CLDN18.2 murini și himerici prin analiza citometrică în flux (Tabel 5 și Tabel 6). Anticorpii care demonstrează legare ridicată de CLDN18.2 au fost selectați pentru selecție privind endocitoza.

Eficiența endocitozei diferiților anticorpi specifici la CLDN18.2 și reactivi la CLDN18.2/CLDN18.1 s-a testat in vitro prin co-incubarea anticorpilor cu fragmente Fab conjugate cu saporină (Fab-ZAP) împreună cu celule HEK293~CLDN18.2 care exprimă CLDN18.2. La co-

5 internalizare cu anticorpul legat de țintă, saporina inhibă biosinteza proteică a celulei ducând la moartea celulelor care poate fi monitorizată printr-un test de viabilitate celulară. Această metodă este o cale indirectă de a evalua endocitoza complexului țintă-anticorp. Anticorpii au fost testați ca anticorpi himerici când sunt disponibili, altfel selecția privind endocitoza s-a efectuat cu anticorpi murini.

chim mAb362 (IMAB362), precum și chim mAB294 se pot internaliza eficient la legarea CLDN18.2, ducând la o reducere a viabilității celulare HEK293~CLDN18.2 chiar și la concentrații foarte

10 mici ale anticorpilor (IMAB362: EC50 = 11 ng/ml; chim mAB294: EC50 = 10 ng/ml). În schimb, chim mAB308 și chim mAB359 nu au redus viabilitatea celulară (Figura 2). Dat fiind că chim mAB294 și chim mAB359 prezintă afinități de legare relative similar și prezintă discrepanțe considerabile de internalizare (chim mAB294: EC50 = 10 ng/ml; chim mAB359: fără endocitoză), eficiența endocitozei pare nu doar să se coreleze cu afinitatea de legare a anticorpului, ci și dependentă de epitopul de legare.

15 Chiar și internalizarea mu mAB362 a fost superioară tuturor celorlalți anticorpi reactivi CLDN18.2 murini testați, care nu au indicat endocitoză substanțială în testul Fab-Zap (Figura 3). Pe scurt, anticorpii specifici CLDN18.2 IMAB362 și chim mAB294 au fost internalizați eficient la legare de CLDN18.2 și sunt adecvați pentru evaluare în continuare sub formă de conjugați anticorp-medicament.

Anticorp	Izotip	EC50 [ng/ml]	EC50 normalizată [%]	Legare max. [MFI]	Legare max. normalizată [%]	CLDN18.1 reactiv	Aminoacizi identificați ai CLDN18.2 umane recunoscute de anticorpi
IMAB362 ¹	IgG1 uman	520	100	15797	100	Nu	A42S, N45Q, E56Q.
IMAB362 ²		584	100	18496	100		
IMAB362 ³		652	100	7952	100		
IMAB362 ⁴		1242	100	5319	100		
mu mAB362 ³	IgG1 de șoarece	2238	343	8826	111		A42S, N45Q, E56Q.
mu mAB362 ⁴		4286	345	5913	111		
mu mAB362 ⁴	IgG2a de șoarece	654	53	4880	92		n.a.
mu mAB359 ³	IgG2b de șoarece	4474	686	4297	54	Nu	n.a.
mu mAB325 ³	IgG1 de șoarece	33263	5102	3672	46	Nu	A42S, E56Q, G65P, L69I
mu mAB62 ³	IgG2a de șoarece	27932	4284	2800	35	Nu	n.a.
mu mAB187 ³	IgG2a de șoarece	26597	4079	2428	31	Nu	N37D, N45Q, Q47E
mu mAB294 ³	IgG2a de șoarece	348	53	989	12	Nu	A42S, E56Q

Anticorp	Izotip	EC50 [ng/ml]	EC50 normalizată [%]	Legare max. [MFI]	Legare max. normalizată [%]	CLDN18.1 reactiv	Aminoacizi identificați ai CLDN18.2 umane recunoscute de anticorpi
mu mAB370 ¹	IgG2a de șoarece	7877	1514	1405	9	Nu	n.a.
mu mAB330 ²	IgG3 de șoarece	11054	1894	1707	9	Nu	n.a.
mu mAB374 ¹	IgG2a de șoarece	8262	1588	468	3	Nu	n.a.
mu mAB385 ¹	IgG1 de șoarece	8534	1640	471	3	Nu	A42S, N45Q, E56Q, G65P, L69I
mu mAB177 ³	IgG1 de șoarece	50	8	136	2	Nu	N37D, A42S, N45Q, Q47E, E56Q, L69I
mu mAB55 ³	IgG2a de șoarece	1945	298	241	3	n.a.	A42S, N45Q, E56Q, G65P, L69I

Tabel 5: Afinitatea și specificitatea relative de legare ale anticorpilor reactivi la CLDN18.2.

Legarea de CLDN18.2 (EC50 normalizată [%] și legarea max. normalizată [%] sunt normalizate la IMAB362) și reactivitatea CLDN18.1 s-au determinat prin citometrie în flux pe celule HEK293 care exprimă stabil proteina respectivă. Epitopul antigenic responsabil de specificitatea CLDN18.2 s-a analizat prin citometrie în flux pe celule HEK293T care supraexprimă temporar mutantul CLDN18.2 corespunzător. n.a.: neanalizat. Anticorpii marcați cu același număr (1, 2, 3 sau 4) s-au testat în același test de legare. 1-3: detecție cu anticorp secundar conjugat cu APC; 4: detecție cu ProteinL-FITC; n.a.: neanalizat.

mu mAB317 ³	IgG1 șoarece	de	41	6	106	1	Nu	Q29M, A42S, N45Q, Q47E, E56Q, G65P, L69I
mu mAB279 ³	IgG2a șoarece	de	27	4	118	1	Nu	n.a.
mu mAB363 ³	IgG1 șoarece	de	15405	2363	877	11	Da	N37D
mu mAB360 ¹	IgG2a șoarece	de	19319	3713	1405	9	Da	n.a.
mu mAB371 ¹	IgG1 șoarece	de	11361	2184	747	5	Da	-
mu mAB382 ²	IgG2b șoarece	de	12424	2129	842	5	Da	-

mu mAB348 ²	IgG2a șoarece	de	13573	2326	703	4	Da	-
mu mAB322 ²	IgG2a șoarece	de	12770	2189	818	4	Da	-
mu mAB321 ²	IgG2a șoarece	de	8082	1385	505	3	Da	n.a.
mu mAB339 ¹	IgG2a șoarece	de	608	117	180	1	Da	n.a.
mu mAB338 ²	IgG1 șoarece	de	3966	680	244	1	Da	N37D

Tabel 6: Afinitatea de legare relativă și endocitoza anticorpilor specifici la CLDN18.2.

Afinitatea de legare relativă [%], legarea max. [%] sau reducerea max. a viabilității [%] normalizată la IMAB362 sunt indicate pentru legare și endocitoză prin citometrie în flux și testul Fab-ZAP. Anticorpii marcați cu același număr (1 sau 2) s-au testat în același test de legare. Evaluarea indirectă a internalizării cu anticorpi marcați cu 1 sau 2 s-a efectuat odată cu anticorpii marcați cu 3 într-un al doilea test de viabilitate celulară. 1: detecție cu anticorp secundar conjugat cu APC; 2 și 3: detecție cu ProteinL-FITC. Secvența de aminoacizi a regiunii variabile a IMAB362 și mAB294 se cunoaște din EP1997832 și WO2013174404 care descrie de asemenea utilizări terapeutice ale anticorpilor respectivi. WO2014146778 descrie tratamentul cancerului gastric cu IMAB362.

Anticorp	Legare				Viabilitate celulară			Aminoacizi identificați ai CLDN18.2 umane recunoscute de anticorpi
	EC50 [ng/ml]	EC50 normalizată [%]	Legare max. [MFI]	Legare max. normalizată [%]	EC50 [ng/ml]	EC50 [%]	Reducere max. a viabilității normalizată [%]	
IMAB362 ¹	584	100	18496	100	11	100	100	A42S, N45Q, E56Q
IMAB362 ²	1242	100	5319	100				
IMAB362 ³								
mu muAB362 ³ (IgG2a)	4286	345	5913	111	30	231	66	n.a.
mu muAB362 ³ (IgG1)	654	53	4880	92	2.2	17	66	A42S, N45Q, E56Q
chim mAB294 ²	5701	459	3089	58	10	91	86	A42S, N45Q, E56Q
chim mAB359 ¹	2752	472	11618	63	fără efect	fără efect	fără efect	A42S, N45Q, E56Q
chim mAB308 ¹	18883	3236	15016	81	fără efect	fără efect	fără efect	N37D, A42S, E56Q
chim mAB62 ¹	32313	5538	4079	22	fără efect	fără efect	fără efect	n.a.
chim mAB279 ¹	60046	10291	4394	24	fără efect	fără efect	fără efect	n.a.

EXEMPLUL 3: CONJUGAREA CU TOXINĂ A IMAB362

Piramal Healthcare a efectuat conjugarea cu toxină, inclusiv schimbul final al soluției tampon. S-au efectuat studii de stabilitate pentru a arăta că ADC rămân în specificație pe o anumită perioadă dacă sunt depozitați în condiții definite. IMAB362 s-a conjugat cu MMAE prin linkerul valină-citrulină clivabil (linker vc) sau cu DM4 prin linkerul N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butirat clivabil (linker SPDB). Conjugarea toxină IMAB362 s-a depozitat în tampon de depozitare (20 mM histidină și 85 mg/ml sucroză, pH 5.8) la 2-8°C.

Tabel 7: Testarea stabilității la 28 de zile a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE.

DAR: raport medicament anticorp

Analiză	Rezultat			
	IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	Ziua 1	Ziua 28	Ziua 1	Ziua 28
DAR	3.2	3.2	4.5	4.0
Monomer [%]	96	95	95	93
Medicament liber [%]	0.4	1.0	nedetectat	0.3

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE demonstrează ambii un conținut ridicat de monomer $\geq 95\%$ și numai cantități mici de medicament liber ($\leq 1\%$). Testarea stabilității la 28 de zile a anticorpilor IMAB362 conjugați cu toxină la o temperatură de depozitare de 2-8°C indică doar o mică scădere a conținutului de monomer și o creștere mică a medicamentului liber pentru ambii ADC. Ambii anticorpi au fost conjugați eficient și prezintă un raport medicament-anticorp de 3.2 pentru IMAB362-DM4 și 4.5 pentru IMAB362-vcMMAE (Tabel 7).

EXEMPLUL 4: LEGAREA IMAB362-ADC

Proprietățile de legare ale IMAB362 au fost testate detaliat anterior:

- IMAB362 se leagă de prima buclă extracelulară a variantei de matisare 2 a claudin 18 (CLDN18.2).
- Afinitatea la CLDN18.2 este în intervalul nanomolar mic.
- Nu s-a observat reactivitate încrucișată cu nici un tip celular sau tisular negativ la CLDN18.2.
- Nu există reactivitate încrucișată cu membrul familiei înrudit cel mai îndeaproape, varianta de matisare 1 a claudin 18 (CLDN18.1).

Afinitățile de legare relative ale anticorpilor IMAB362 conjugați cu DM4 și MMAE s-au comparat cu IMAB362 neconjugat prin citometrie în flux folosind linii celulare care exprimă endogen și ectopic CLDN18.2. Proprietățile de legare s-au testat la diferite concentrații ale anticorpului într-un interval de 0.1 până la 20 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 4, Tabel 8).

Tabel 8: Prezentarea testelor de legare efectuate cu conjugați IMAB362-toxină pe linii celulare pozitive la CLDN18.2.

Bmax: legare maximă, MFI: intensitate medie a fluorescenței

Linie celulară	IMAB362		IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]
HEK293~simulare	-	-	-	-	-	-
HEK293~CLDN18.2	18318	1121	19481	1472	14159	1594
HEK293~CLDN18.1	-	-	-	-	-	-
DAN-G1C5F2	-	-	-	-	-	-
NCI-N87	-	-	-	-	-	-
NCI-N87~CLDN18.2	33678	310	28605	274	16569	103

Linie celulară	IMAB362		IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]	Bmax [MFI]	EC50 [ng/ml]
NUGC-4 10cF7-5 sort 3a	67484	1671	77500	2600	68009	2520
	54277	2384	69633	3909	45597	4049
NUGC-4 10cE8	34805	1570	35799	3046	29103	2826
	28336	3673	36049	7487	25785	5464
BxPC-3-CLDN18.2	51380	104	76629	507	47197	183
	28664	113	35700	425	25404	261

Comparativ cu IMAB362 neconjugat, IMAB362 conjugat cu DM4 și MMAE au prezentat afinități de legare relative ușor reduse pe celule care exprimă endogen și ectopic CLDN18.2 (Figura 4, Tabel 8). Ambii anticorpi conjugați cu toxină au avut valori EC50 foarte similare, dar valori de legare maximă ușor diferite, IMAB362-DM4 prezentând legare maximă mai mare (Tabel 8).

Legarea mediată de CLDN18.2 a anticorpilor conjugați IMAB362-toxină a fost testată pe celule care supraexprimă ectopic CLDN18.2 și pe linii celulare parentale CLDN18.2 negative corespunzătoare (Figura 5, Tabel 8).

Legarea IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE depinde strict de prezența moleculei sale țintă CLDN18.2 (Figura 5). Specificitatea de legare s-a analizat prin citometrie în flux folosind transfectanți HEK293 modificați să supraexprime CLDN18.2 umană sau proteina umană CLDN18.1 foarte asemănătoare. Celulele HEK293~simulate s-au folosit ca un control negativ (Figura 6, Tabel 8).

IMAB362 și anticorpii conjugați cu toxină IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE s-au legat cu afinități relative similare de celule HEK293~CLDN18.2 care exprimă ectopic CLDN18.2 umană (Tabel 8). În plus, IMAB362, IMAB362 conjugat cu DM4 și MMAE nu au prezentat reactivitate încrucișată cu CLDN18.1 umană sau celule transfectate simulate (Figura 6B și C).

EXEMPLUL 5: EFICIENȚA ȘI SPECIFICITATEA IMAB362-ADC IN VITRO

1. Influența asupra viabilității celulare

Influența IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE asupra viabilității celulare a fost testată cu mai multe linii celulare canceroase gastrice și pancreatice umane care exprimă endogen și ectopic CLDN18.2 folosind un test colorimetric pe bază de XTT pentru cuantificarea spectrofotometrică a celulelor metabolice active. Activitățile anti-tumorale au fost testate la diferite concentrații ale anticorpilor într-un interval de 3 până la 16875 ng/ml (Figura 7, Tabel 9).

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au inhibat eficient viabilitatea liniei celulare de cancer gastric NUGC-4, NCI-N87~CLDN18.2 și a liniei celulare pancreatice BxPC-3~CEDN18.2 in vitro (Figura 7). Ambii conjugați IMAB362-toxină au inhibat viabilitățile celulare ale celulelor NUGC-4 care exprimă endogen CLDN18.2 (valori EC50: 155 - 631 ng/ml, reducerea maximă a viabilității: ≥ 85%) și ale celulelor BxPC-3~CEDN18.2 care exprimă ectopic CLDN18.2 (valori EC50: 43 - 54 ng/ml, reducerea maximă a viabilității: ≥ 83%) și ale celulelor NCI-N87~CLDN18.2 (valori EC50: 75 - 180 ng/ml, reducerea maximă a viabilității: 45 - 61%) la concentrații similare (Figura 7, Tabel 9).

Tabel 9: Prezentarea testelor de viabilitate efectuate cu conjugați IMAB362-toxină pe linii celulare pozitive la CLDN18.2.

Linie celulară	IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	EC50 [ng/ml]	Reducere viabilitate [%]	EC50 [ng/ml]	Reducere viabilitate [%]
NCI-N87~CLDN18.2	75	49	100	45
	108	61	180	56

Linie celulară	IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	EC50 [ng/ml]	Reducere viabilitate [%]	EC50 [ng/ml]	Reducere viabilitate [%]
NUGC-4 10cF7-5 sort 3a	155	88	338	86
NUGC-4 10cE8	372	69	631	67
BxPC-3~CLDN18.2	43	83	48	86
	54	87	43	84

În plus, activitatea anti-tumorală mediată de țintă a unui conjugat IMAB362-toxină a fost testată *in vitro* folosind linia celulară negativă NCI-N87 CLDN18.2 și linia celulară NCI-N87~CLDN18.2 transfectată stabil (Figura 8). IMAB362-vcMMAE a inhibat viabilitatea celulară numai pe celule CLDN18.2 pozitive, nu pe celule CLDN18.2 negative. Așadar, activitatea IMAB362-vcMMAE depinde strict de expresia CLDN18.2 (Figura 8).

Specificitatea anticorpilor IMAB362 conjugați cu toxină a fost analizată folosind transfecții HEK293 care supraexprimă CLDN18.2 umană sau proteina umană foarte asemănătoare CLDN18.1. Celulele HEK293 transfectate stabil cu vectorul gol s-au utilizat ca un control negativ (Figura 9). IMAB362-vcMMAE reduce viabilitatea pe celule CLDN18.2 pozitive, nu pe celule CLDN18.2 negative. Efectul este strict specific pentru CLDN18.2 fiindcă nu s-a observat inhibare a proliferării pe celule care exprimă proteina omologă 18.1 (Figura 9).

În rezumat, IMAB362-vcMMAE și IMAB362-DM4 au prezentat eficiențe similare *in vitro* și ambii ADC au inhibat foarte eficient viabilitatea celulară a câtorva linii celulare canceroase gastrice și pancreatice umane. Efectul depinde strict de expresia țintă.

2. Efect martor

Activitatea martor a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE *in vitro* s-a determinat folosind culturi celulare tumorale mixte constând din linii celulare pozitive și negative la CLDN18.2. Celulele PA-1(Luc) negative la țintă care exprimă stabil luciferaza de licurici s-au folosit ca celule reporter pentru a măsura liza celulară.

Activitatea luciferazei co-culturilor de celule PA-1(Luc) care exprimă luciferază și NUGC-4 negative la luciferază a arătat că tratamentul cu IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE a eliminat celulele PA-1(Luc) negative la țintă foarte eficient în prezența celulelor NUGC-4 pozitive la țintă. În plus, celulele PA-1(Luc) nu au fost afectate în absența celulelor care exprimă CLDN18.2 (Figura 10).

În rezumat, ADC IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au putut induce un efect martor pe celule tumorale CLDN18.2-negative învecinate. Ambele toxine au fost eliberate eficient din IMAB362 în celule canceroase pozitive la CLDN18.2 și, datorită permeabilității membranare, pot exercita activitate citotoxică pe celule martor.

EXEMPLUL 6: EFICIENȚA ANTI-TUMORALĂ A IMAB362-ADC IN VIVO

1. Studii ale dozei maxime tolerate

Într-un prim experiment *in vivo*, doza maximă tolerată (MTD) a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE s-a determinat la șoareci fără păr cu tumori de xenogrefă pancreatică BxPC-3~CLDN18.2 umane avansate. MTD se referă la cea mai mare doză într-un tratament care va produce efectul dorit fără toxicitate inacceptabilă.

1.1. MTD a IMAB362-DM4

Celulele BxPC-3~CLDN18.2 care exprimă ectopic CLDN18.2 umană s-au injectat subcutanat în șoareci Hsd:atimici fără păr-Foxnlnu femele. După ce tumorile au atins o dimensiune medie de $75 \pm 13 \text{ mm}^3$ (medie $\pm$ SD) în ziua 13, șoarecii au fost grupați în grupuri de control și anticorp. Șoarecii au primit o doză unică de 7.5 sau 15 mg/kg IMAB362-DM4 prin injecție în bolus IV în ziua 14 sau doze repetate de 15 mg/kg IMAB362-DM4 prin injecții în bolus IV în ziua 14 și day 21. Șoarecii din grupul de control au primit vehicul în ziua 14. În ziua 49 după grefare, animalele au fost sacrificate. Pentru testarea toxicității, s-au colectat probe de sânge și organele au fost pregătite și depozitate pentru alte studii histopatologice.

Creștere tumorală:

IMAB362-DM4 a inhibat creșterea tumorală la șoareci cu tumori de xenogrefă BxPC-3~CLDN18.2 umane avansate. Tratamentele unice sau repetate cu IMAB362-DM4 au dus la regresii tumorale aproape complete la toți șoarecii tratați în timpul perioadei de observare a studiului (49 zile),

independent de doză. Astfel, o doză unică de 7.5 mg/kg IMAB362-DM4 poate fi suficientă pentru remisie tumorală completă (Figura 11).

Starea de sănătate:

Greutatea corporală, comportamentul animalelor și starea generală de sănătate s-au monitorizat de două ori pe săptămână. Toate animalele au prezentat greutate corporală normală pe durata experimentelor (Figura 12). Nu s-au observat anomalii comportamentale. Totuși, un animal a decedat după aplicarea intravenoasă a celei de-a doua doze de 15 mg/kg IMAB362-DM4 din cauză necunoscută.

Analiza chimică clinică:

Am determinat nivelurile serice de alanin transaminază (GPT), aspartat transaminază (GOT), glutamat dehidrogenază (GLDH), fosfatază alcalină (AP), α -amilază, colinesterază, creatinin kinază (CK), lactat dehidrogenază (LDH), lipază, uree, glucoză, proteină totală și albumină. Nu s-au detectat diferențe între grupurile cu vehicul și the IMAB362-DM4 (Figura 13). Creatinina și gamma-glutamyl transferaza au fost sub limita de detecție în toate grupurile (date nereprezentate). Toate animalele din toate grupurile au prezentat niveluri serice normale ale markerilor surrogat testați pentru toxicitate hepatică, nefronică sau pancreatică chiar și după doze repetate de 15 mg/kg IMAB362-DM4.

În rezumat, 15 mg/kg IMAB362-DM4 (echivalent cu 45 mg/m² la om) ca o singură administrare au fost bine tolerate la șoareci și au demonstrat eficiență anti-tumorală mare în tratamentul xenogrefelor pozitive la CLDN18.2. Din cauza limitărilor de concentrație și volum al injecției, injectarea intravenoasă a dozelor mai mari nu a fost fezabilă și nu s-a putut determina doza unică maximă tolerată.

Analiza histologică:

Pentru analiza histologică, secțiuni în parafină din creier, inimă, rinichi, ficat, plămân, pancreas, splină și stomac au fost colorate cu hematoxină-eozină și examinate microscopic cu privire la modificări morfologice mediate de IMAB362-vcMMAE. Nu s-au observat modificări morfologice în secțiuni tisulare de la animale tratate cu IMAB362-DM4 comparativ cu șoarecii tratați cu vehicul. În mod remarcabil, stomacul, singurul țesut care exprimă Cldn18.2 murină, nu a demonstrat deteriorare tisulară mediată de terapia cu anticorpi (Figura 14).

1.2. MTD a IMAB362-vcMMAE

MTD a IMAB362-vcMMAE s-a testat folosind același model de șoarece ca pentru IMAB362-DM4 (1.1). Șoarecii au fost grupați după ce tumorile au atins o dimensiune medie de $111 \pm 27 \text{ mm}^3$ (medie $\pm$ SD) în ziua 13 și tratați cu o singură injecție IV în bolus de 8 sau 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE (echivalent cu 24 și 48 mg/m² la om) în ziua 14 sau cu doze repetate de injecții IV în bolus de 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE în zilele 14 și 21. Șoarecii din grupul de control au primit control vehicul în ziua 14. Animalele au fost sacrificate în ziua 37. S-a determinat biochimia clinică și organele au fost prelevate și depozitate pentru alte studii histopatologice.

Creștere tumorală:

Tratamentul cu IMAB362-vcMMAE a indus regresie tumorală și a inhibat creșterea tumorală la șoareci cu tumori de xenogrefă BxPC-3~CLDN8.2 umane avansate. La sfârșitul studiului (37 zile), tratamentele unice sau repetate cu IMAB362-vcMMAE au dus la regresii tumorale aproape complete la toți șoarecii tratați, independent de doză. Astfel, o singură doză de 8 mg/kg IMAB362-vcMMAE poate fi suficientă pentru remisia tumorală completă (Figura 15).

Starea de sănătate:

Greutatea corporală, comportamentul animalelor și starea generală de sănătate s-au monitorizat de două ori pe săptămână. Toate animalele au prezentat greutate corporală normală pe durata experimentelor (Figura 16). Două animale (un șoarece din grupul SD și grupul RD) au fost apatici o scurtă vreme direct după prima injecție de 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE. Totuși, acest comportament anormal nu a fost observat la un alt animal sau după a doua aplicare a IMAB362-vcMMAE.

Analiza chimică clinică:

Am determinat nivelurile serice ale markerilor surrogat pentru toxicitate hepatică, nefronică sau pancreatică (alanin transaminază (GPT), aspartat transaminază (GOT), glutamat dehidrogenază (GLDH), fosfatază alcalină (AP), α -amilază, colinesterază, creatinin kinază (CK), lactat dehidrogenază (LDH), lipază, uree, glucoză, proteină totală și albumină). Comparativ cu grupul de control vehicul, nu s-au observat abateri majore ale markerilor surrogat serici la animalele tratate cu IMAB362-vcMMAE (Figura 17). Creatinina și gamma-glutamyl transferaza au fost sub limita de detecție în toate grupurile. Nu se observă așadar semne de toxicitate hepatică, pancreatică sau nefronică în biochimia clinică în intervalul de doză evaluat.

Analiza histologică:

Pentru analiza histologică, secțiuni în parafină din creier, inimă, rinichi, ficat, plămân, pancreas, splină și stomac au fost colorate cu hematoxină-eozină și examinate microscopic cu privire la modificări morfologice mediate de IMAB362-vcMMAE.

Nu s-au observat modificări morfologice legate de IMAB362-vcMMAE în secțiuni tisulare de la animale tratate cu IMAB362-vcMMAE comparativ cu șoarecii tratați cu vehicul, indicând că IMAB362-vcMMAE nu induce nici deteriorare tisulară, nici inflamație. În mod remarcabil, nici chiar stomacul, singurul țesut care exprimă Cldn18.2 murină, nu a demonstrat deteriorare tisulară mediată de terapia cu anticorpi (Figura 22).

2. Studii de eficiență

Efectele anti-tumorale ale IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au fost analizate *in vivo* la șoareci Nude-Foxn1^{nu} atimici greșați subcutanat cu celule de carcinom uman care exprimă endogen sau ectopic CLDN18.2. Doza terapeutică optimă a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE în modele tumorale animale s-a determinat în studii de determinare a intervalului de doze (Figura 18 și Figura 20). S-au efectuat alte studii de eficiență pe tumori de xenografă umane cu doza optimă de IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE (Figura 19 și Figura 21).

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE inhibă foarte semnificativ creșterea tumorală și îmbunătățesc supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori în diferite modele de xenografă incipientă (inițierea terapiei la 3 zile după implant tumoral), precum și în tratamentele tumorilor solide avansate (inițierea terapiei la dimensiune tumorală -100 mm³).

Tratamentul tumorilor de xenografă gastrice NCI-N87~CLDN18.2 umane avansate:

Într-un studiu de determinare a intervalului de doze, eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE s-a analizat la șoareci cu tumori de xenografă NCI-N87~CLDN18.2 pozitive la CLDN18.2 avansate. La 13 zile după grefare, animalele au fost tratate cu 15.2, 7.6 sau 3.8 mg/kg IMAB362-DM4 sau 16, 8 sau 4 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau control vehicul aplicate ca injecții IV în bolus individuale. Animalele din grupul de control au primit 8 mg/kg IMAB362 neconjugat (de două ori pe săptămână, IV/i.p.).

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au inhibat foarte semnificativ creșterea tumorală, au mediat regresia tumorală și au prelungit supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori într-o manieră dependentă de doză, în timp ce anticorpii simpli IMAB362 în acest model de tratament avansat nu a prezentat efecte anti-tumorale statistic semnificative (Figura 18). Ambii anticorpi IMAB362 conjugați cu toxina au prelungit supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori (supraviețuire medie: 73 zile în grupul de vehicul comparativ cu 143 de zile în grupul cu IMAB362-vcMMAE 16 mg/kg și 136 de zile în grupul IMAB362-DM4 15.2 mg/kg) (Figura 18).

Tratamentul tumorilor de xenografă gastrice NUGC-4 10cF7-5 sort3a umane incipiente:

Eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE s-a analizat la șoareci greșați subcutanat cu celule de carcinom gastric NUGC-4 10cF7-5 sort3a care exprimă endogen CLDN18.2. Animalele au fost tratate în ziua 3 post grefare cu injecție IV într-o singură doză de 15.2 mg/kg IMAB362-DM4, 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau control vehicul.

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au prevenit creșterea tumorală la animalele tratate, în timp ce toți șoarecii din grupul de control au dezvoltat tumori ($p < 0.0001$) (Figura 19). După timpul de observare predefinit de 120 de zile, 9 din 10 animale care au primit IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE erau vii și lipsiți de tumori, în timp ce toate animalele din grupul de control vehicul a trebuit să fie eutate din cauza criteriilor de oprire cel mai târziu în ziua 41 după grefare (supraviețuire medie 34 zile, $p < 0.0003$) (Figura 19).

Tratamentul tumorilor de xenografă pancreatică BxPC-3~CLDN18.2 umane avansate:

Activitatea anti-tumorală dependentă de doză a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE *in vivo* s-a analizat într-un studiu de determinare a intervalului de doze la șoareci cu tumori de xenografă pancreatică BxPC-3~CLDN18.2 umane avansate. Animalele au fost tratate în ziua 14 cu 15.2, 7.6 sau 3.8 mg/kg IMAB362-DM4, 16, 8 sau 4 mg/kg IMAB362-vcMMAE, vehicul administrate ca injecții IV în bolus unice sau cu doze repetate de 8 mg/kg IMAB362 (de două ori pe săptămână, IV/i.p.).

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au inhibat foarte semnificativ creșterea tumorală, au mediat regresia tumorală și au prelungit supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori într-o manieră dependentă de doză. În schimb, IMAB362 neconjugat nu a prezentat activități anti-tumorale statistic semnificative în acest model de tumoare avansată (Figura 20). Ambii anticorpi IMAB362 conjugați cu toxina au prelungit foarte semnificativ supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori (supraviețuire medie: 48 zile în grupul cu vehicul comparativ cu 98.5 zile în grupul cu IMAB362-vcMMAE 16 mg/kg și 81 zile în grupul IMAB362-DM4 15.2 mg/kg) (Figura 20).

Tratamentul tumorilor de xenografă pancreatică DAN-G 1C5F2 umane incipiente:

Activitatea anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE *in vivo* a fost testată la șoareci greșați subcutanat cu celule de carcinom pancreatic DAN-G 1C5F2 care exprimă endogen CLDN18.2. Celulele DAN-G 1C5F2 au doar cantități extrem de mici de CLDN18.2 pe suprafață; deși pot fi detectate cantități considerabile de proteină sau ARN prin immunoblot sau qRT-PCR. Analizele IHC

ale tumorilor de xenogrefă DAN-G 1C5F2 au demonstrat că numai o subpopulație de celule tumorale a prezentat colorare CLDN18.2 asociată cu membrana moderată până la puternică. Așadar, tumorile de xenogrefă DAN-G 1C5F2 pot fi adecvate pentru tratament cu conjugați anticorp-medicament care prezintă distrugere martor. Animalele au fost tratate în ziua 3 post grefare cu injecție IV în doză unică de

15.2 mg/kg IMAB362-DM4, 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau control vehicul.

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au inhibat foarte semnificativ creșterea tumorală și au prelungit supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori comparativ cu controlul vehicul (Figura 21). La majoritatea șoarecilor (> 50%), creșterea tumorală a fost prevenită complet. După perioada de observare de 120 de zile, 2 din 7 animale în grupul de tratament IMAB362-DM4 (supraviețuire medie 87 zile, $p=0.0002$) și 4 din 7 animale în grupul IMAB362-vcMMAE erau încă vii (supraviețuire nedefinită, $p=0.0006$), în timp ce toate animalele din grupul cu vehicul a trebuit să fie eutanasiate în termen de 31 de zile din cauza criteriilor de oprire, cum ar fi cașexie cauzată de cancer (supraviețuire medie 24 zile) (Figura 21). Ambii IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE inhibă semnificativ creșterea tumorală și prelungesc supraviețuirea șoarecilor cu tumori de xenogrefă prezentând expresie CLDN18.2 eterogenă.

În rezumat, tumorile cu expresie mică și/sau eterogenă a CLDN18.2 (de ex. tumori de xenogrefă NUGC-4 și DAN-G) pot fi tratate eficient cu IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE și o mare parte din animalele purtătoare de tumori s-au vindecat. Activitățile anti-tumorale ale ambilor ADC pot fi explicate pe baza efectului martor: eliberarea formelor permeabile prin membrană ale DM4 și MMAE după procesarea celulară facilitează distrugerea celulelor tumorale învecinate chiar dacă sunt negative la țintă. Așadar, ambii ADC sunt foarte eficienți în eradicarea tumorilor conținând numai fracțiuni de celule pozitive la CLDN18.2.

EXEMPLUL 7: INDUCEREA APOPTOZEI

Citotoxicitatea IMAB362 conjugat cu toxină a fost evaluată prin teste de apoptoză care măsoară activitatea caspazei 3/7 și externalizarea fosfatidilserinei. Activarea caspazei reprezintă unul dintre cei mai timpurii markeri măsurabili ai apoptozei, care este important pentru inițierea morții celulare programate (Henkart 1996). Activitatea caspazei 3/7 a fost determinată într-un test pe bază de luciferază prin clivarea unui substrat pro-luminogenic specific caspazei 3/7. Un alt eveniment timpuriu în apoptoză a fost monitorizat prin citometrie în flux utilizând anexină V conjugată cu fluorescență (Vermes et al. 1995). Anexina V se leagă specific de fosfatidilserina care este translocată din stratul interior al membranei plasmatică în stratul exterior imediat după inducerea apoptozei. Pentru a distinge celulele vii de cele moarte, celulele sunt colorate cu colorant ADN iodură de propidiu (PI).

Pentru a analiza inducerea apoptozei, celulele NUGC4 CLDN18.2- pozitive au fost tratate cu o singură doză de conjugați IMAB362-toxină câteva zile. Celulele netratate și celulele tratate cu IMAB362 neconjugat au avut rol de control (Figura 23). După 3 zile, celulele tratate cu IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE au prezentat activități crescute ale caspazei 3/7, în timp ce incubarea cu anticorpul simplu nu a influențat activitatea caspazei (Figura 23A). Colorarea cu anexină V și PI s-a utilizat ca un parametru independent pentru a verifica inducerea apoptozei de către anticorpii IMAB362 conjugați cu toxină. La 4 zile după tratament, s-a constatat că ~50% din celulele tratate cu IMAB362-DM4 sau IMAB362-vcMMAE sunt pozitive la anexina V sau anexina V/PI, indicând că moartea celulară a avut loc prin inducerea apoptozei. În schimb, IMAB362 simplu fără legare încrucișată nu induce apoptoza în intervalul de concentrație aplicat (Figura 23B). În rezumat, tratamentul celulelor tumorale CLDN18.2- pozitive cu IMAB362 conjugat cu DM4 sau vcMMAE induce apoptoza.

EXEMPLUL 8: TRATAMENTUL TUMORILȘOE DE XENOGREFĂ GASTRICE NUGC-4 10CF7-5 SORT3A UMANE AVANSATE

Eficiența anti-tumorală a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE s-a analizat la șoareci grefați subcutanat cu celule de carcinom gastric NUGC-4 10cF7-5 sort3a care exprimă endogen CLDN18.2. Animalele cu tumori avansate (dimensiune tumorală ~200 mm³) au fost tratate în ziua 10 post grefare prin injecție IV de 15.2 mg/kg IMAB362-DM4, 16 mg/kg IMAB362-vcMMAE sau control vehicul și, după reapariția tumorilor în grupurile tratate cu conjugat IMAB362, prin o a doua injecție de medicament (ziua 38).

IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au inhibat semnificativ creșterea tumorală și au mediat regresia tumorală la toate animalele tratate (ziua 52), în timp ce toți șoarecii din grupul de control au dezvoltat tumori (IMAB362-DM4: $p<0.05$; IMAB362-vcMMAE: $p<0.001$) (Figura 24). La 28 de zile după terapie (ziua 38 post grefare), s-a observat creștere tumorală recurentă (dimensiune tumoare $\geq 100\text{mm}^3$) la 50% din animalele din grupul tratat cu IMAB362-DM4. A doua injecție de IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE a dus din nou la remisie parțială sau completă a tumorilor. Creșterea tumorală recurentă s-a observat la 7 din 8 animale din grupul IMAB362-DM4 și 4 din 8 animale din grupul IMAB362-vcMMAE. După un timp predefinit de la încheierea tratamentului (ziua 108 post grefă), 4 din 8 animale din grupul IMAB362-vcMMAE și un animal din grupul IMAB362-DM4 și IMAB362

erau vii, în timp ce toate animalele din grupul cu vehicul au decedat cel mai târziu în ziua 52 post grefare (supraviețuire medie 32.5 zile pentru vehicul, 90 zile pentru IMAB362-DM4 ($p<0.0003$ vs vehicul) și nedefinită pentru IMAB362-vcMMAE ($p<0.0003$ vs vehicul)) (Figura 24).

EXEMPLUL 9: INDUCEREA CITOTOXICITĂȚII CELULARE DEPENDENTE DE ANTICORP (ADCC) ȘI CITOTOXICITĂȚII DEPENDENTE DE COMPLEMENT (CDC)

Citotoxicitate celulară dependentă de anticorp (ADCC):

Activitățile ADCC ale anticorpilor IMAB362 conjugați cu DM4 și MMAE s-au comparat cu IMAB362 neconjugat folosind celule de carcinom stomacal uman NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10 care exprimă endogen CLDN18.2 (Figura 25, Tabel 10).

Tabel 10: Activitatea ADCC a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE pe celule NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10

Donator	IMAB362		IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]
Donator 1	75	1228	66	1151	73	1085
Donator 2	82	142	92	217	92	275

Ambii anticorpi conjugați cu toxină, IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE, au prezentat valori similare de EC50 și liză maximă comparativ cu anticorpus neconjugat IMAB362, indicând că activitatea ADCC a fost reținută după conjugarea cu medicament.

Citotoxicitate dependentă de complement (CDC):

Activitățile CDC ale IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE au fost analizate pe celule de carcinom stomacal uman NUGC-4 10cF7_5 sort3A p3151#10 și KATO-III FGF-BP#12 adM p3151#25 care exprimă endogen CLDN18.2 (Figura 26, Tabel 11).

Tabel 11: Activitatea CDC a IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE pe celule de carcinom care exprimă endogen CLDN18.2.

Linie celulară	IMAB362		IMAB362-DM4		IMAB362-vcMMAE	
	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]	Liză max [%]	EC50 [ng/ml]
KATO-III FGF-BP#12 adM p3151#25	43	19292	56	6439	51	7244
NUGC-4 10cF7_5 sort3a p3151#10	54	28043	48	15759	49	28338

Activitatea CDC nu a fost afectată de conjugarea toxinelor cu anticorpus IMAB362. Ambii anticorpi conjugați cu toxină, IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE, au prezentat valori cel puțin similare de EC50 și liză maximă comparativ cu anticorpus neconjugat IMAB362.

Astfel, IMAB362-DM4 și IMAB362-vcMMAE combină citotoxicitatea mediată de toxină cu citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp și citotoxicitatea dependentă de complement, modurile de acțiune majore ale IMAB362 neconjugat, îmbunătățind astfel activitatea terapeutică totală.

Referința dosarului solicitantului sau al agentului 342-84 PCT	Cerere internațională nr.
---	---------------------------

**INDICAȚII REFERITOARE LA MICROORGANISME
SAU ALTE MATERIALE BIOLOGICE DEPOZITATE**

(Regula PCT 13bis)

A. Indicațiile de mai jos se referă la microorganismul depus sau la alte materiale biologice la care se face referire în descrierea de la pagina 40, rândul 25.	
B. IDENTIFICAREA DEPOZITULUI Alte depozite sunt identificate pe o foaie suplimentară ☒	
Numele instituției de depozitare DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Adresa instituției de depozitare (inclusiv codul poștal și țara) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Data depozitului October 19, 2005	Număr de accesare DSM ACC2737
C. INDICAȚII SUPLIMENTARE (lăsați în alb dacă nu este cazul). Aceste informații se continuă pe o foaie suplimentară ☐	
- Mielomul de șoarece (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fuzionat cu splenocite de șoarece (Mus musculus)	
- Hibrideri care secretă un anticorp împotriva claudinei-18A2 umană	
D. STATELE DESEMNAȚE PENTRU CARE SUNT FACUTE INDICAȚIILE (în cazul în care indicațiile nu sunt pentru toate statele desemnate)	
E. FURNIZARE SEPARATĂ A INDICAȚIILOR (lăsați în alb dacă nu este cazul)	
Indicațiile enumerate mai jos vor fi prezentate ulterior Biroului Internațional (precizați natura generală a indicațiilor, de exemplu, "Numărul de acces al depozitului").	

Numai pentru uzul biroului de recepție	Numai pentru uzul Biroului Internațional
☐ Această fișă a fost primită odată cu cererea internațională.	☐ Această fișă a fost primită de Biroul Internațional la data de:
Ofițer autorizat	Ofițer autorizat

Formularul PCT/RO/134 (iulie 1998; retipărire ianuarie 2004)

Fişă suplimentară a materialului biologic**Identificarea altor depuneri:**

- 5 1) Numele și adresa instituției de depunere (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748):

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Mascheroder Weg 1b

38124 Braunschweig

10 DE

- 2) Numele și adresa instituției de depunere (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810):

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Inhoffenstr. 7 B

38124 Braunschweig

15 DE

Data depunere	Numere de referință	Indicațiile de mai jos se referă la pagina(ile) din descriere în care se menționează microorganismul depus
19 octombrie 2005	DSM ACC2738	pagina 40, rândul 20
19 octombrie 2005	DSM ACC2739	pagina 40, rândul 21
19 octombrie 2005	DSM ACC2740	pagina 40, rândul 22
19 octombrie 2005	DSM ACC2741	pagina 40, rândul 23
19 octombrie 2005	DSM ACC2742	pagina 40, rândul 24
19 octombrie 2005	DSM ACC2743	pagina 40, rândul 25
17 noiembrie 2005	DSM ACC2745	pagina 40, rândul 26
17 noiembrie 2005	DSM ACC2746	pagina 40, rândul 27
17 noiembrie 2005	DSM ACC2747	pagina 40, rândul 28
17 noiembrie 2005	DSM ACC2748	pagina 40, rândul 30
26 octombrie 2006	DSM ACC2808	pagina 40, rândul 31
26 octombrie 2006	DSM ACC2809	pagina 40, rândul 32

Dată depunere	Numere de referință	Indicațiile de mai jos se referă la pagina(ile) din descriere în care se menționează microorganismul depus
26 octombrie 2006	DSM ACC2810	pagina 40, rândul 33

Alte indicații referitoare la depunerile de mai sus:

- Mielom de șoarece (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fuzionate cu splenocite de șoarece (Mus musculus)
- Hibridom care secretă anticorp împotriva claudin-18A2 umane

3) Deponent:

Toate depunerile menționate mai sus au fost efectuate de:

Ganymed Pharmaceuticals AG

Freiligrathstrasse 12

55131 Mainz

DE

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A1- 1 997 832
- Ganymed Pharmaceuticals AG: "Ideal Monoclonal Antibodies against Cancer : 2nd Generation IMAB", Ganymed Pharmaceuticals AG , 28 February 2015 (2015-02-28), XP002751833, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.ganymed-pharmaceuticals.com/pipeline/2nd-generation-imab.html> [retrieved on 2015-12-03]
- KOMINSKY S L: "Claudins: Emerging targets for cancer therapy", EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, vol. 8, no. 18, 1 August 2006 (2006-08-01) , pages 1-11, XP009091855, ISSN: 1462-3994, DOI: 10.1017/S1462399406000056
- WO-A1-2013/174404
- SAHIN UGUR ET AL: "Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 23, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 7624-7634, XP002588324, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1547 cited in the application
- WO-A1-2014/146778
- WO-A1-2015/014870

(57) Revendicări:

1. Un conjugat anticorp-medicament pentru utilizare în tratarea unui cancer care exprimă CLDN18.2 prin administrarea conjugatului anticorp-medicament la un pacient, conjugatul anticorp-medicament cuprinzând un anticorp care se leagă de CLDN18.2 atașat covalent de cel puțin o fracțiune medicamentoasă toxică, unde anticorpul este selectat din grupul constând din:

(a) un anticorp cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 și un lanț ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39; și

(b) un anticorp cuprinzând un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 și un lanț ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35,

unde anticorpul este atașat de fracțiunea medicamentoasă toxică printr-un linker clivabil de către o protează intracelulară și opțional unde fracțiunea medicamentoasă toxică este un agent citotoxic sau citostatic.

2. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform revendicării 1, unde anticorpul cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 32 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 39.

3. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, unde anticorpul cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 17 sau 51 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 24.

4. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform revendicării 1, unde anticorpul cuprinde un lanț greu cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 30 și un lanț ușor cuprinzând o secvență de aminoacizi reprezentată de SEQ ID NO: 35.

5. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 4, unde fracțiunea medicamentoasă toxică este un maytansinoid sau o auristatină, unde maytansinoidul este de preferință selectat din grupul constând din DM1 și DM4 și unde auristatina este de preferință selectată din grupul constând din monometil auristatină E (MMAE) și monometil auristatină F (MMAF).

6. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 5, unde linkerul este un linker clivabil de o catepsină.

7. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 6, unde linkerul cuprinde o dipeptidă.

8. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform revendicării 7, unde dipeptida este val-cit sau phe-lys.

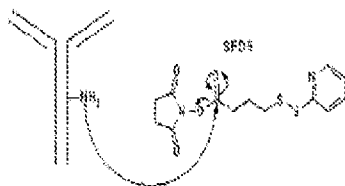
9. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 8, cuprinzând de asemenea administrarea terapiei chirurgicale, chimioterapiei și/sau radioterapiei.

10. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 9, unde cancerul este un adenocarcinom, în mod specific un adenocarcinom avansat.

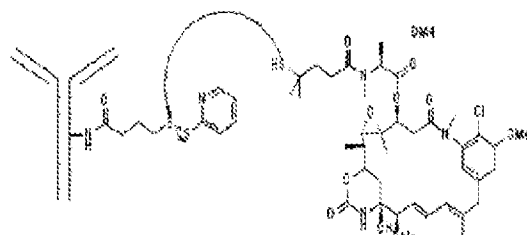
11. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 10, unde cancerul este selectat din grupul constând din cancer gastric, cancer esofagian, cancer pancreatic, cancer pulmonar cum ar fi cancer pulmonar macrocelular (NSCLC), cancer mamar, cancer ovarian, cancer de colon, cancer hepatic, cancer la cap și gât, cancer de vezică biliară și metastaza acestora, o tumoare Krukenberg, metastază peritoneală și/sau metastază în ganglioni limfatici.

12. Conjugatul anticorp-medicament pentru utilizare conform oricăreia din revendicările de la 1 la 11, unde cancerul este selectat din grupul constând din cancer de stomac, cancer de esofag, în mod specific esofag inferior, cancer al joncțiunii eso-gastrice și cancer gastroesofagian.

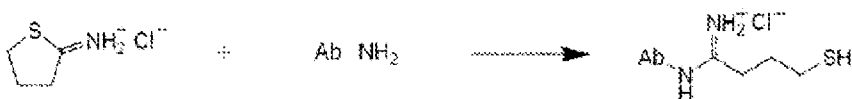
A) Modificare cu SPDP:



Conjugare cu DM4:



B) Toliare cu 2 IT:



Conjugare cu vcMMAE:

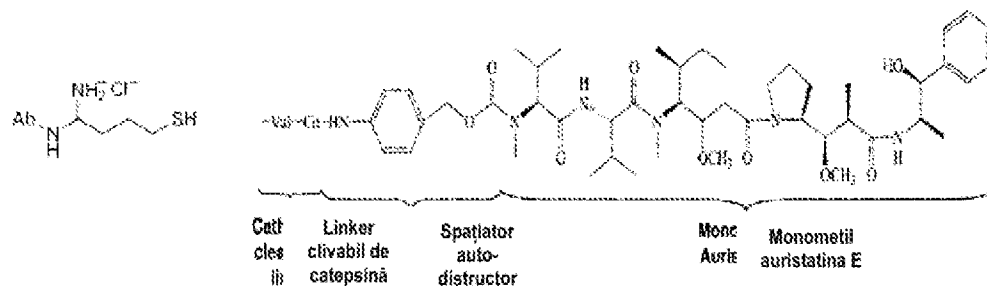


Fig. 1

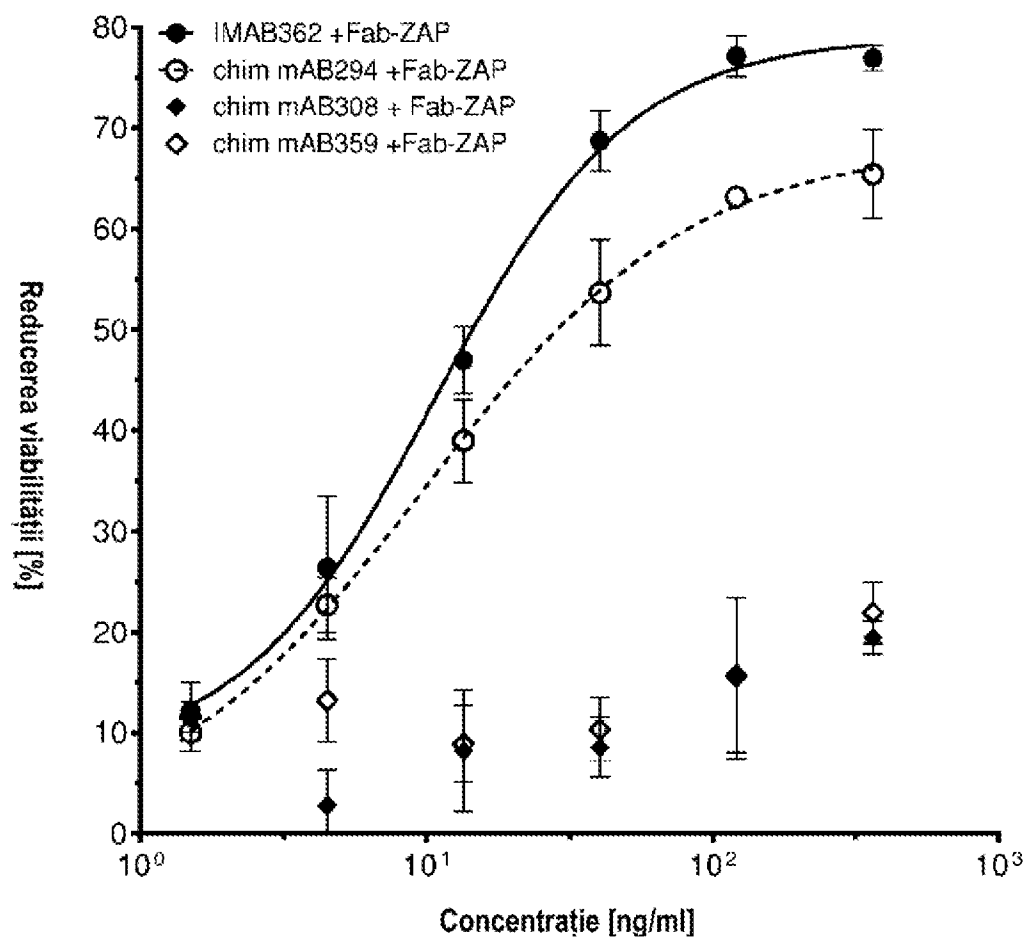


Fig. 2

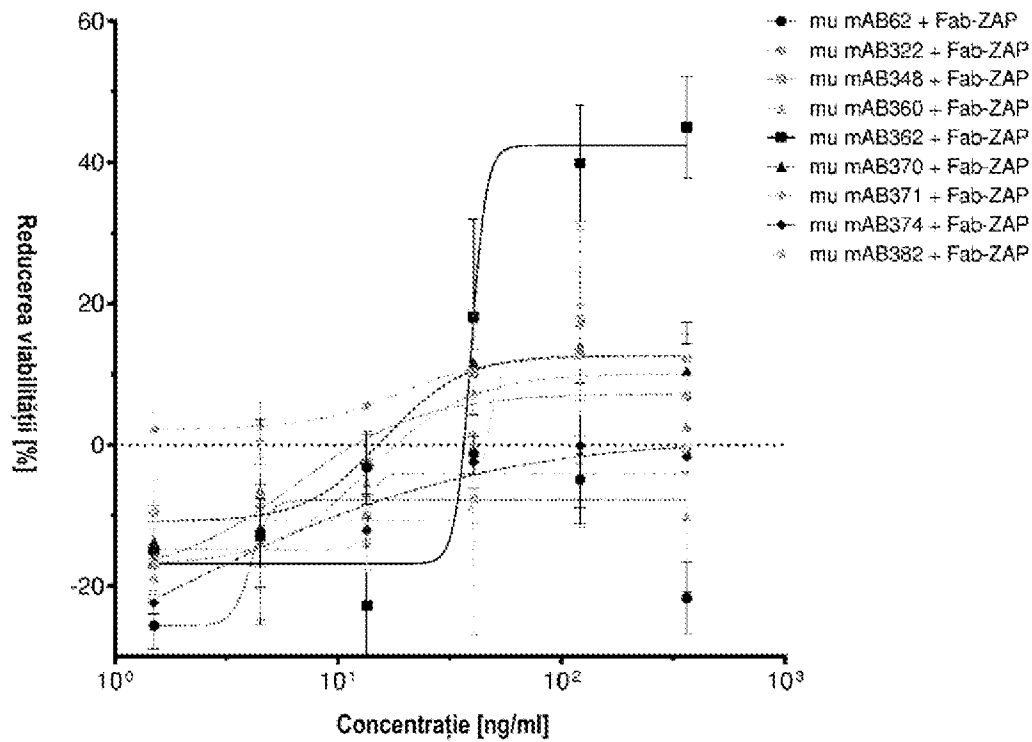


Fig. 3

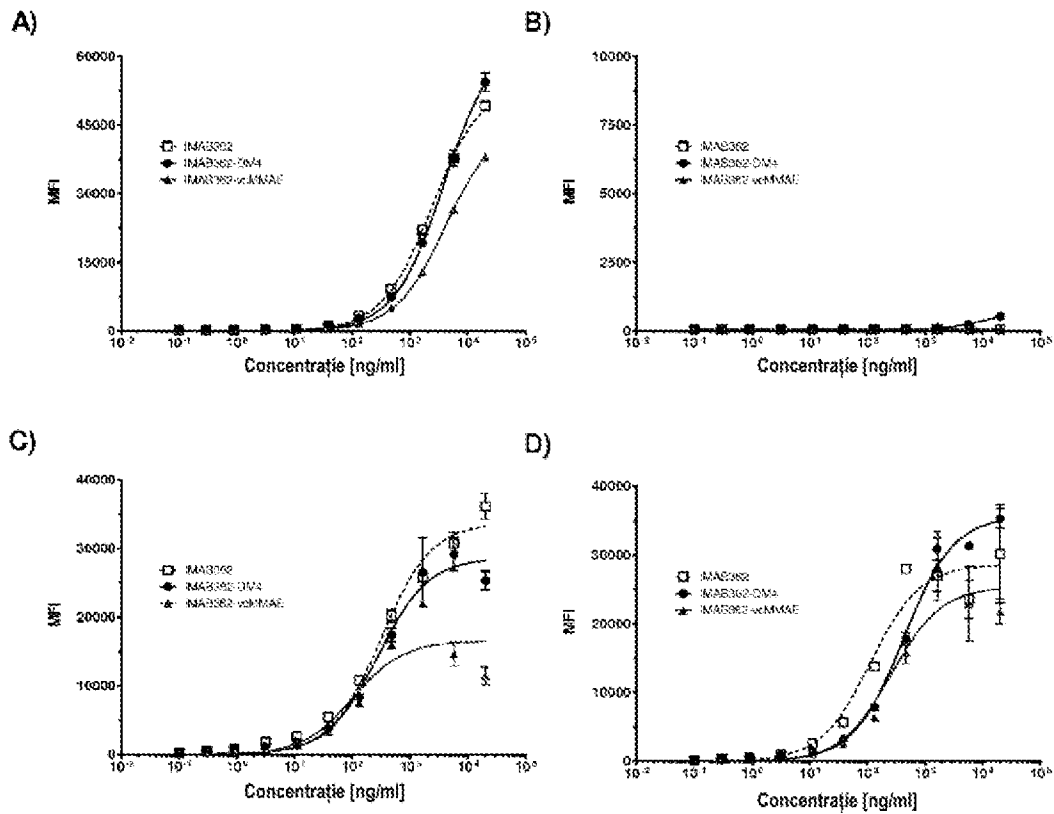


Fig. 4

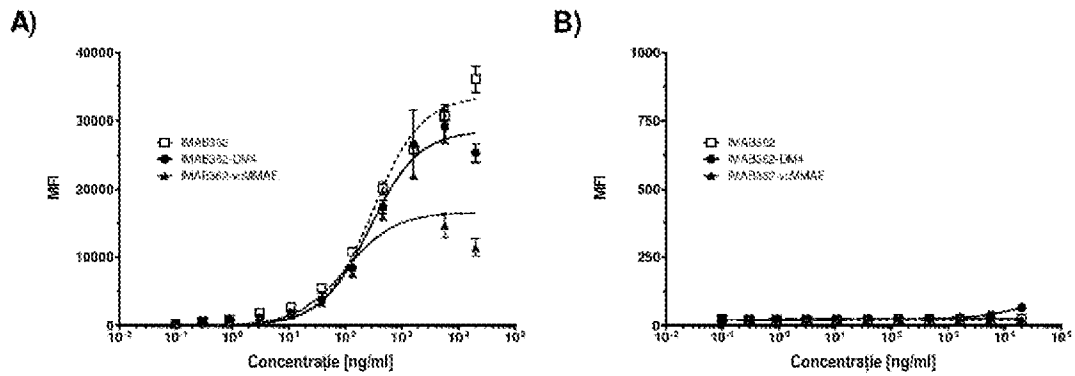


Fig. 5

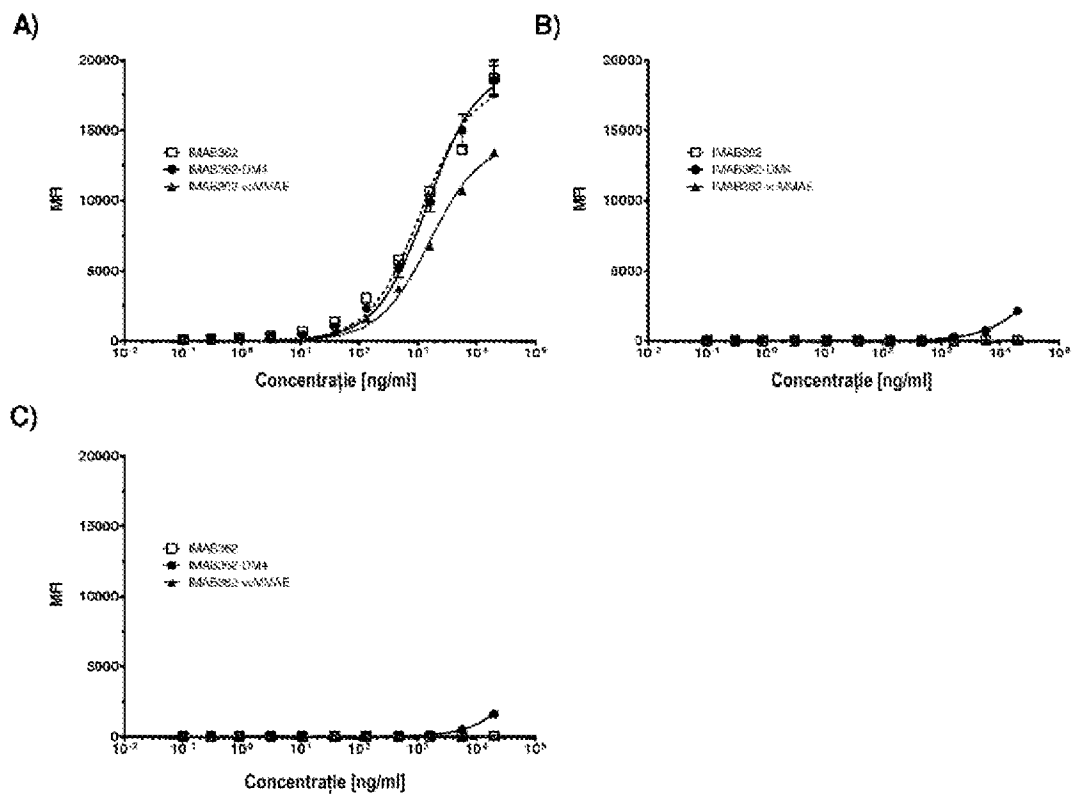


Fig. 6

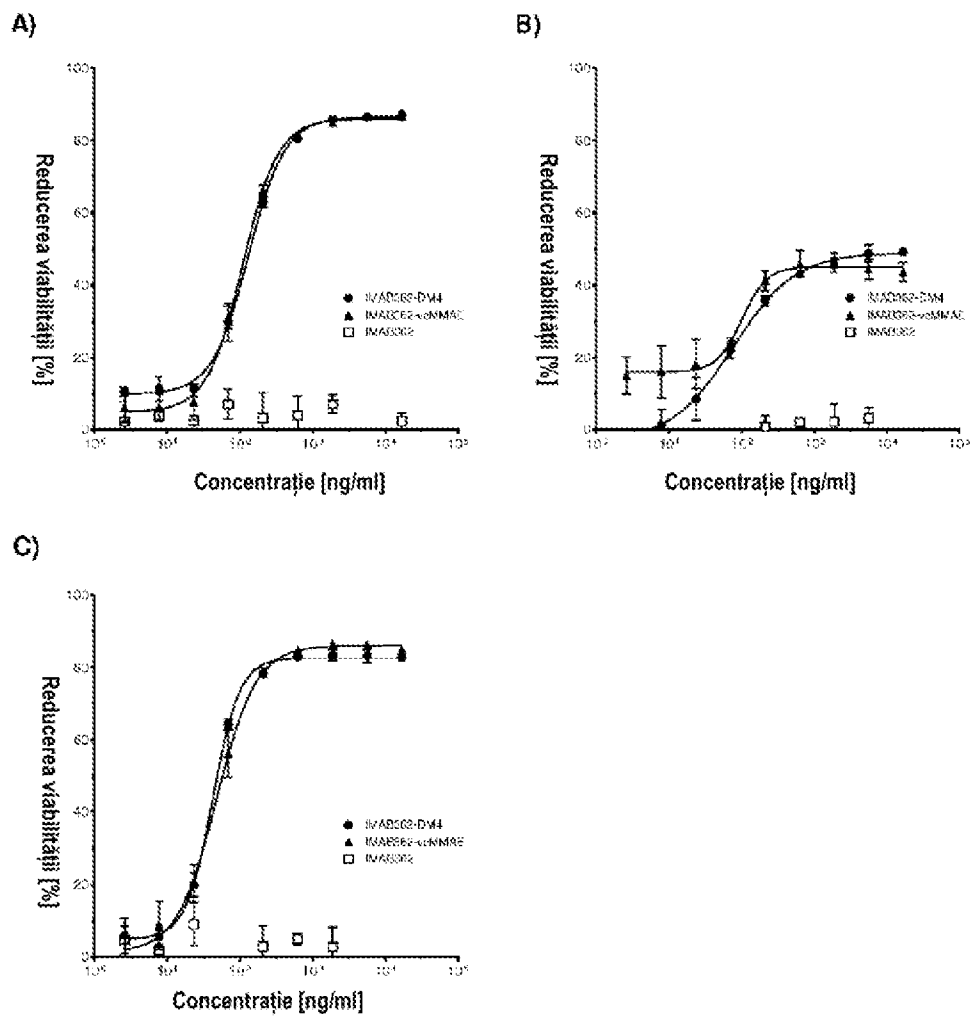


Fig. 7

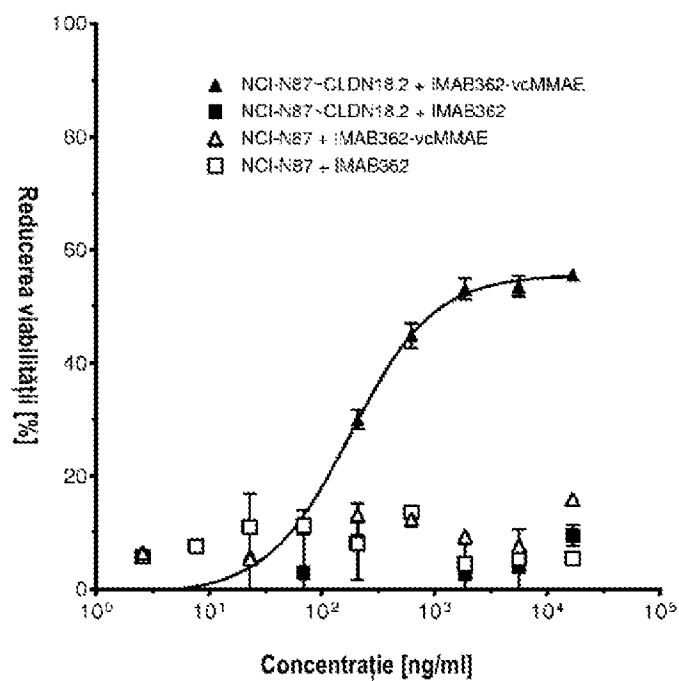


Fig. 8

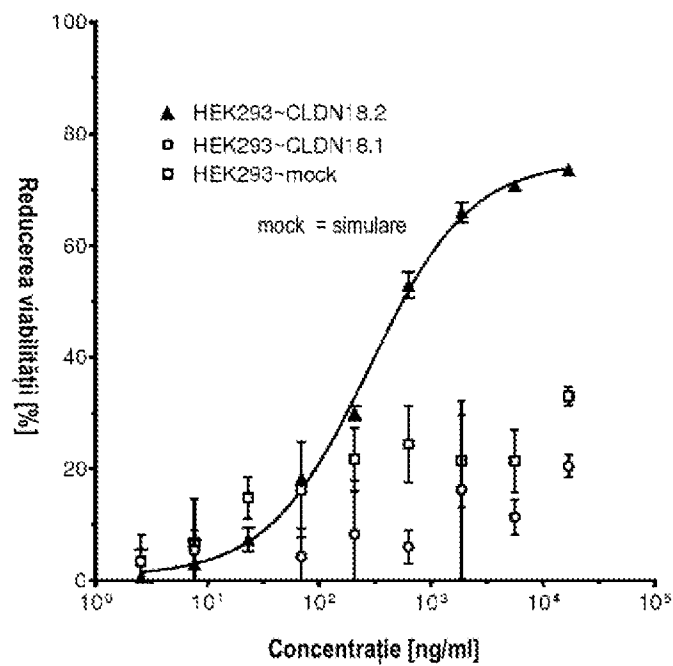


Fig. 9

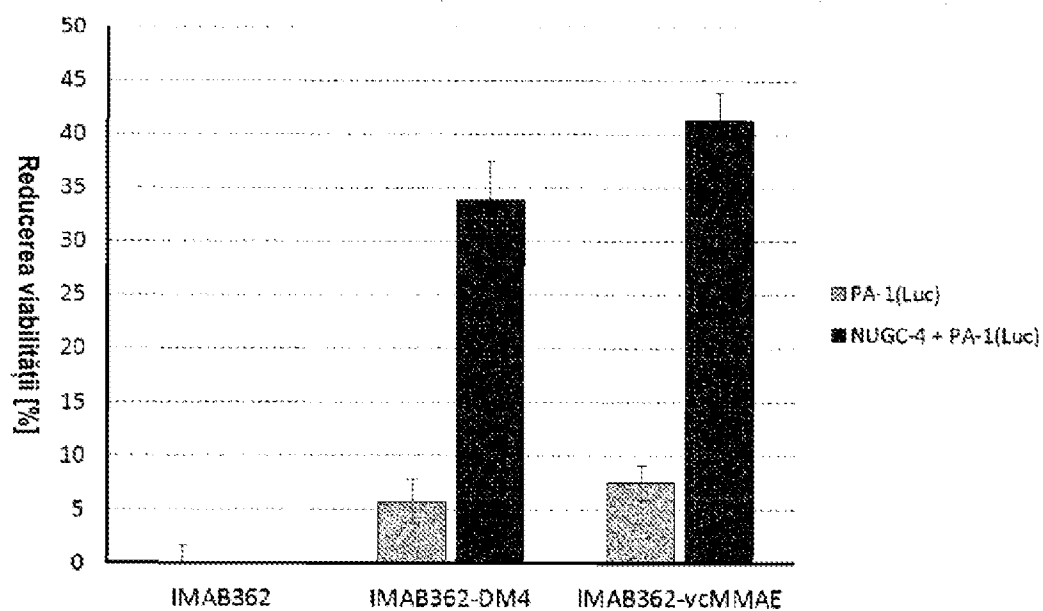


Fig. 10

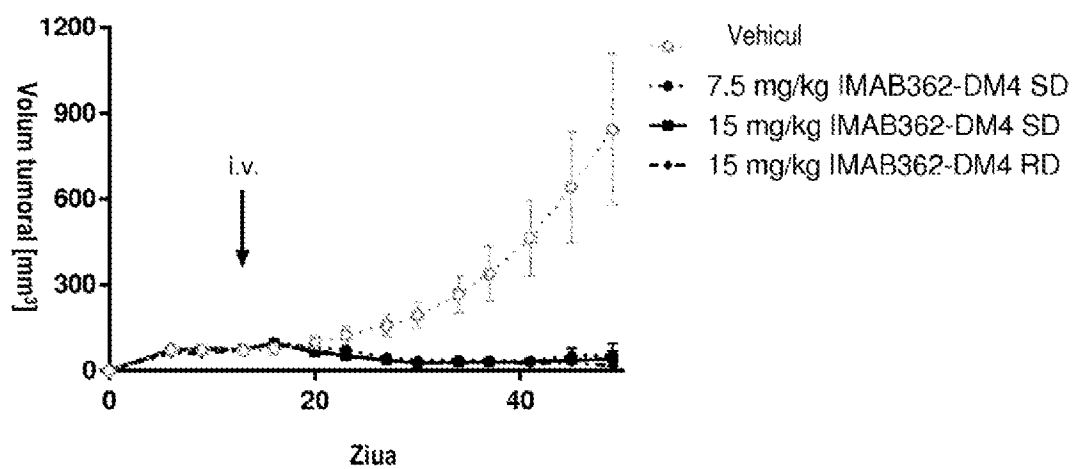


Fig. 11

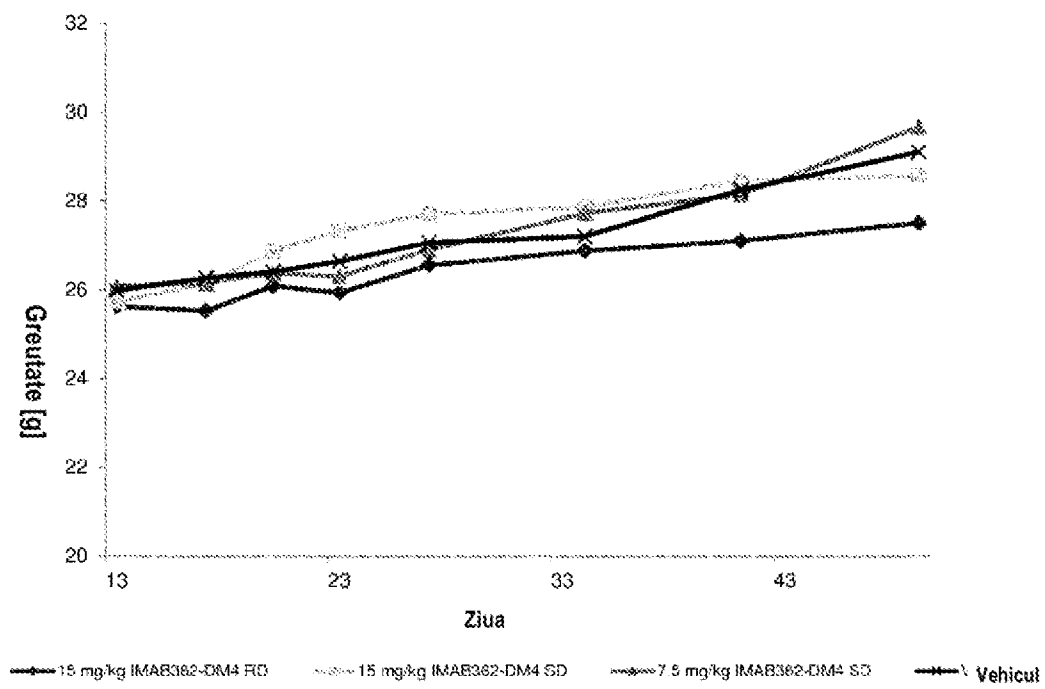


Fig. 12

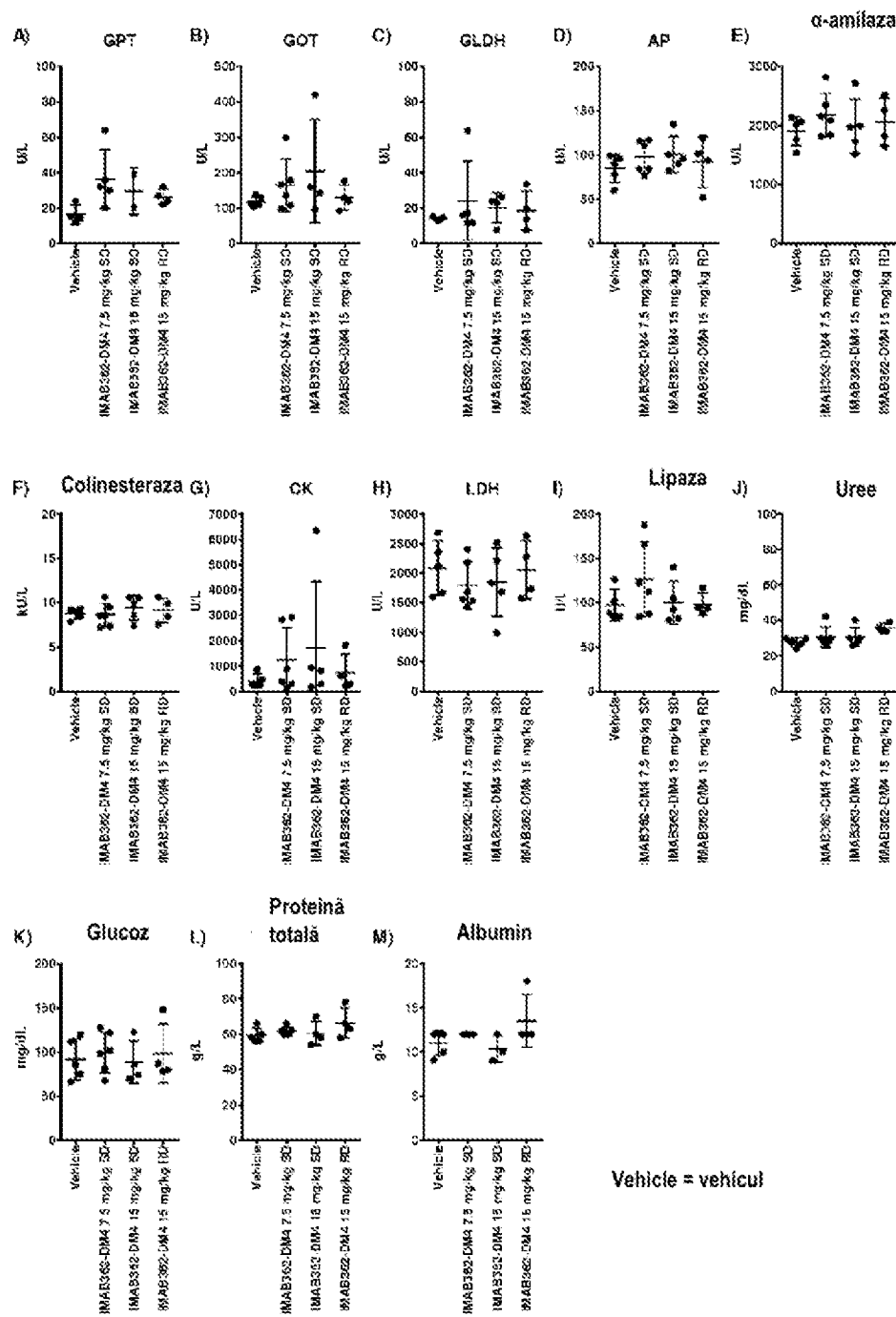


Fig. 13

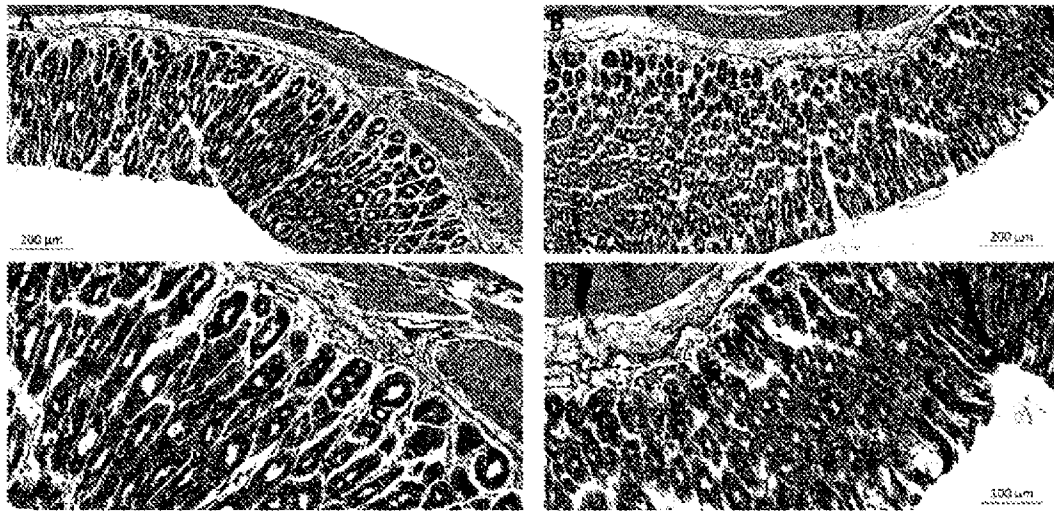


Fig. 14

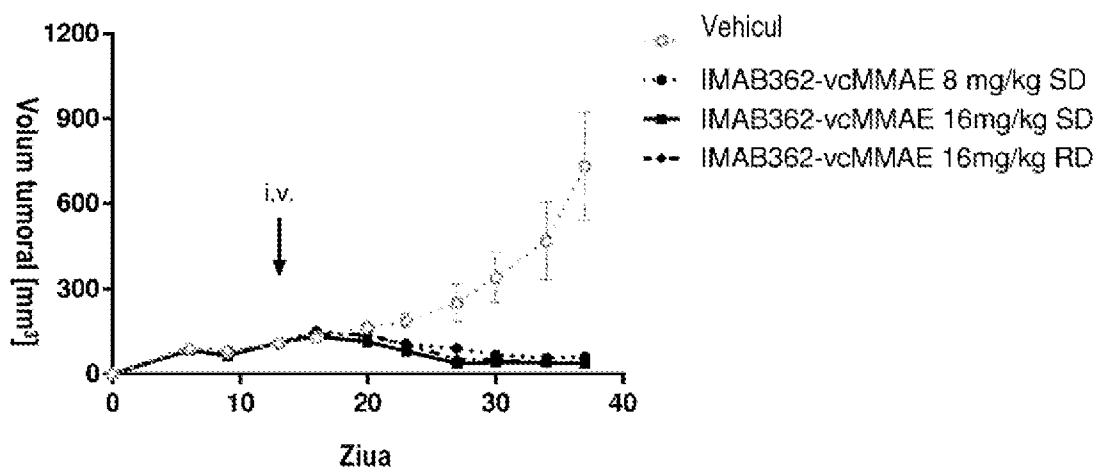


Fig. 15

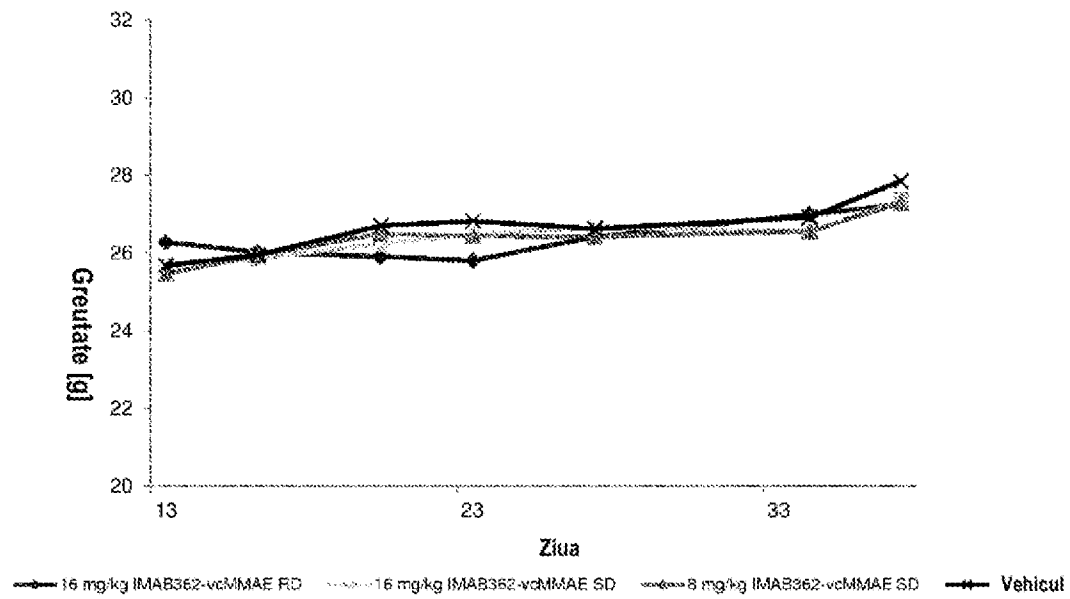


Fig. 16

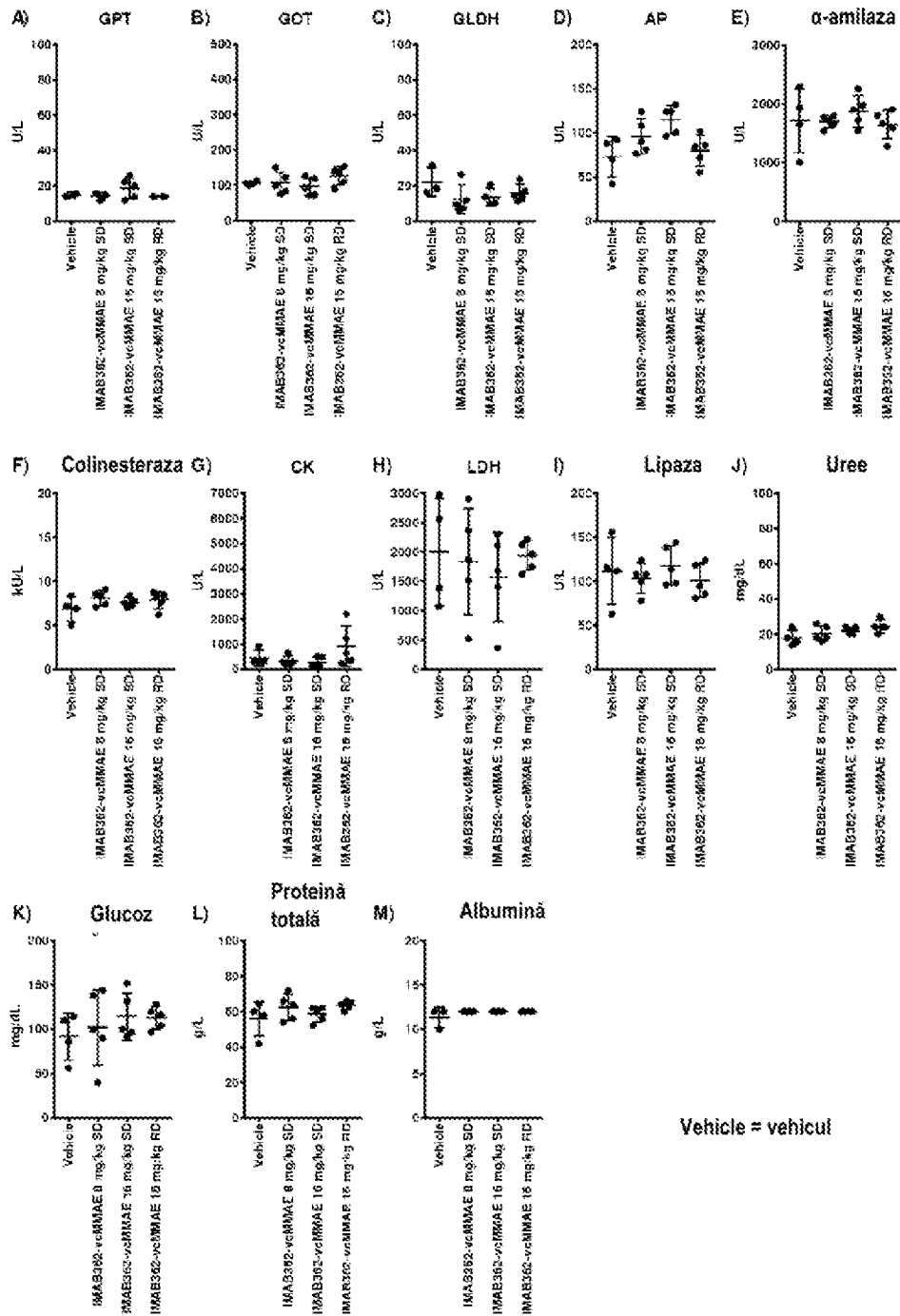
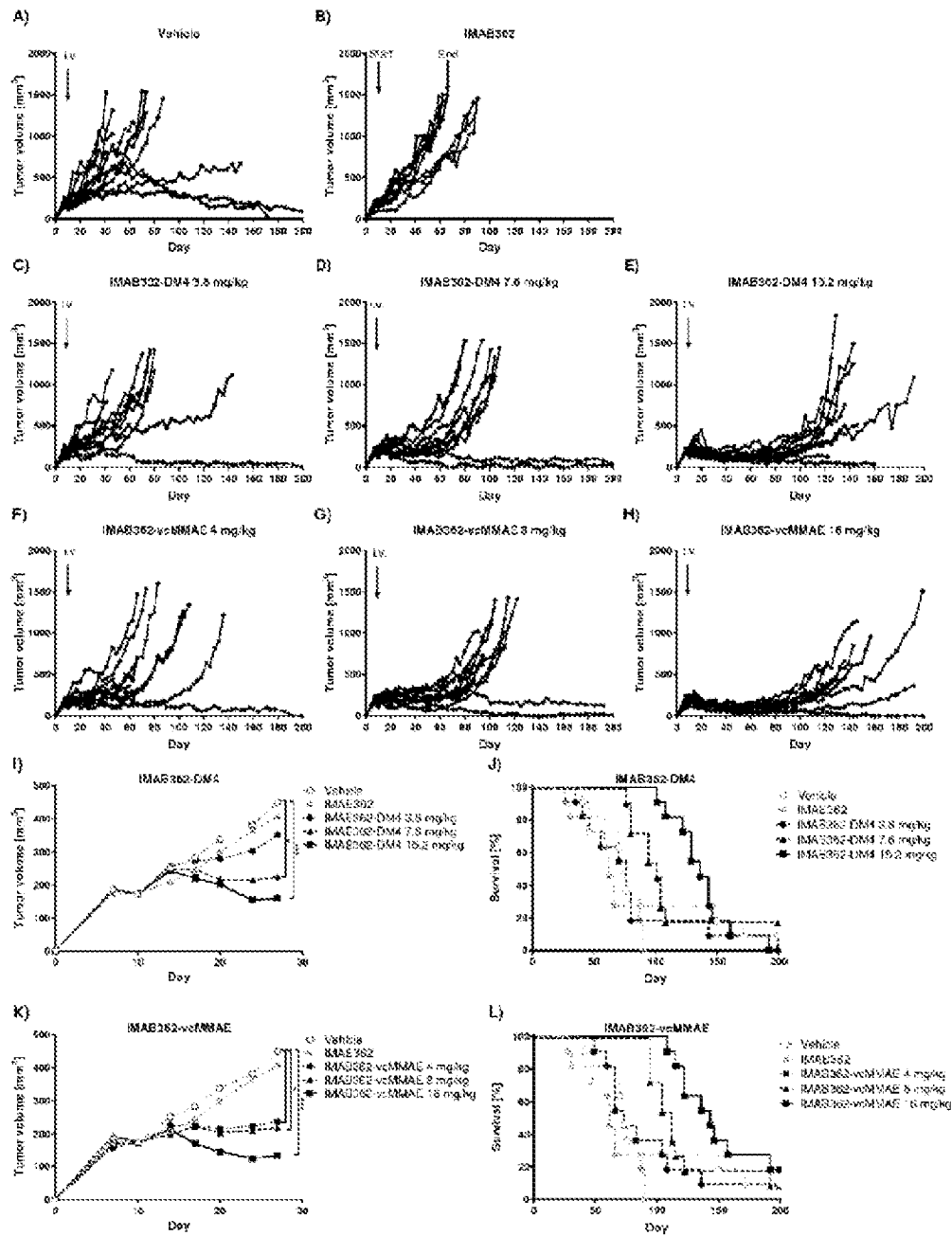
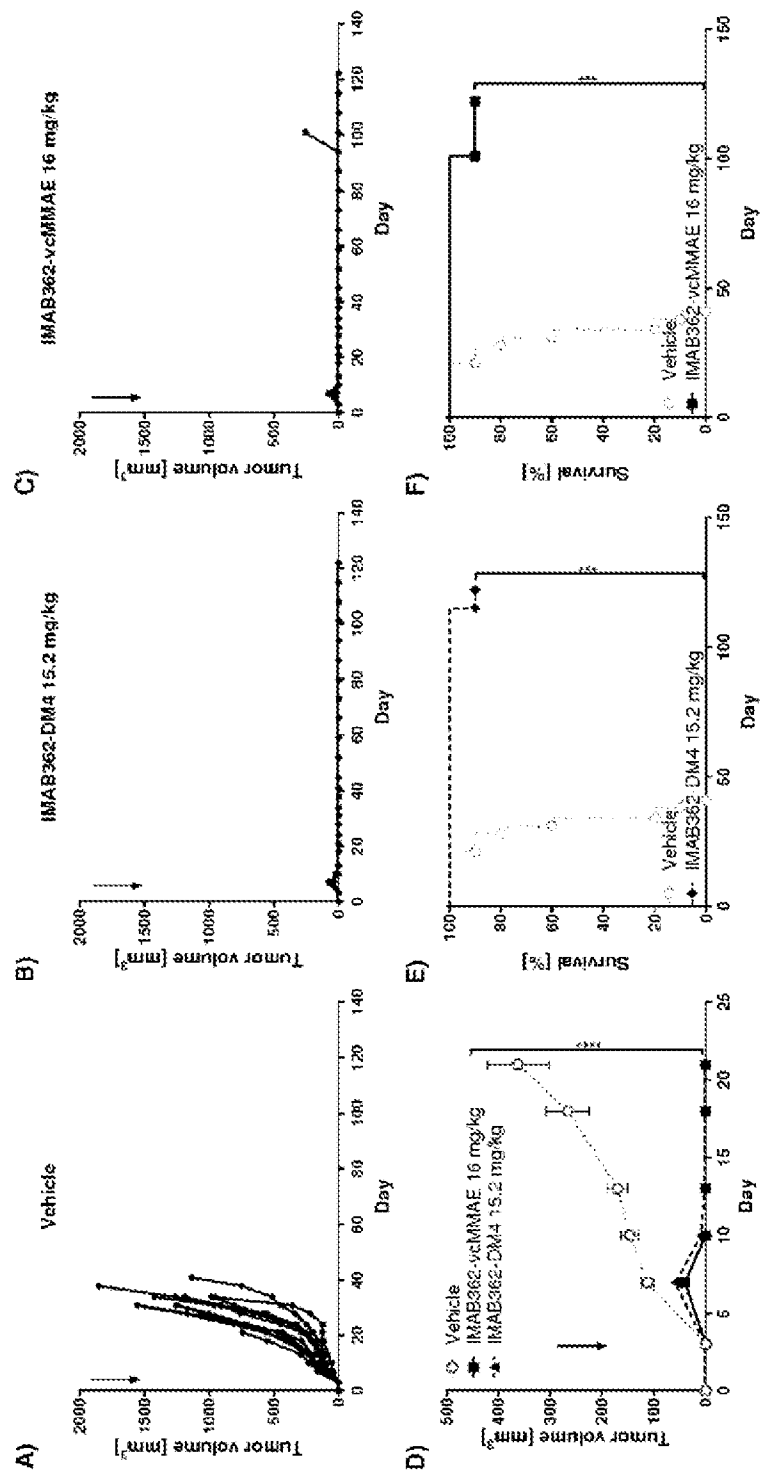


Fig. 17



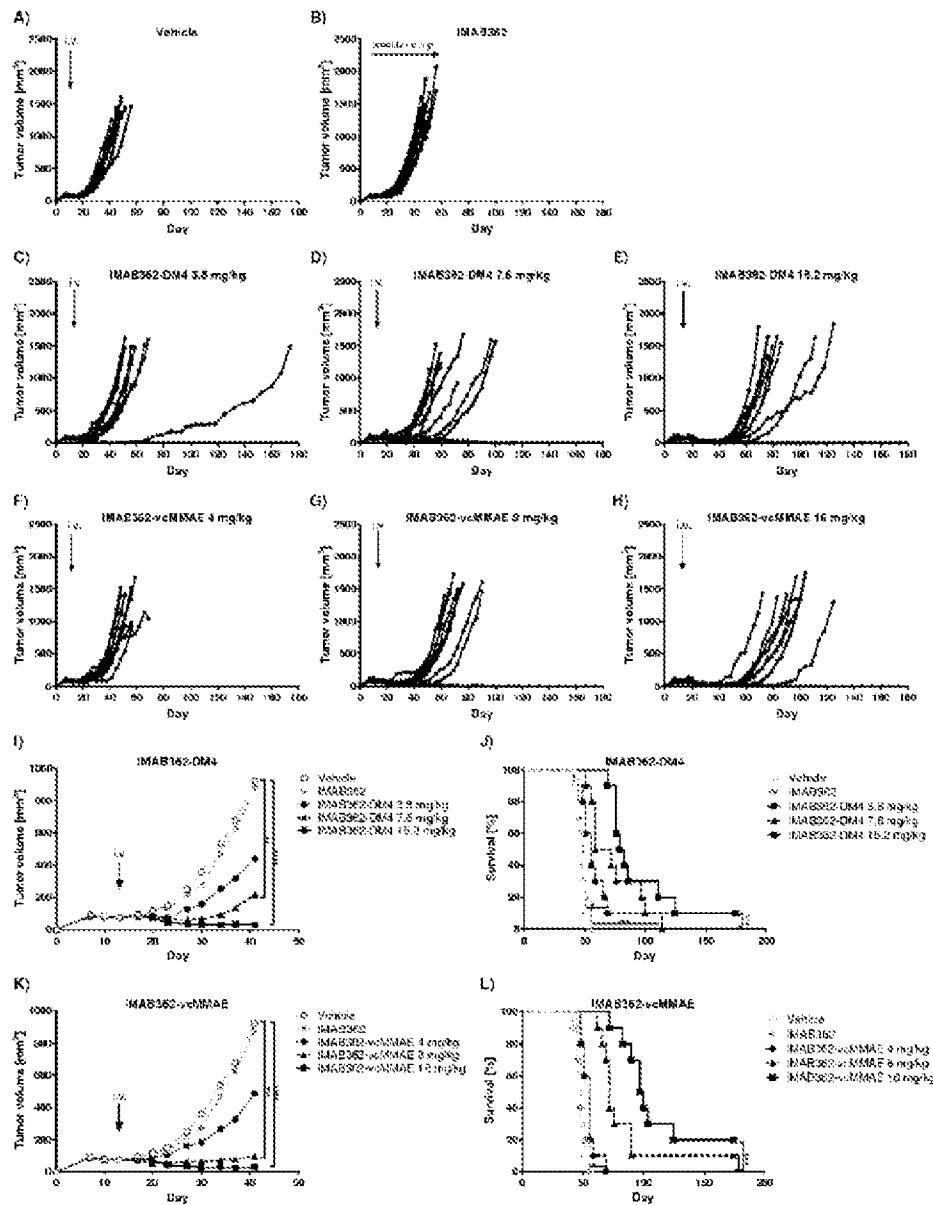
Vehicle = vehicul
Tumor volume = volum tumoral
Day = ziua
Survival = supraviețuire

Fig. 18



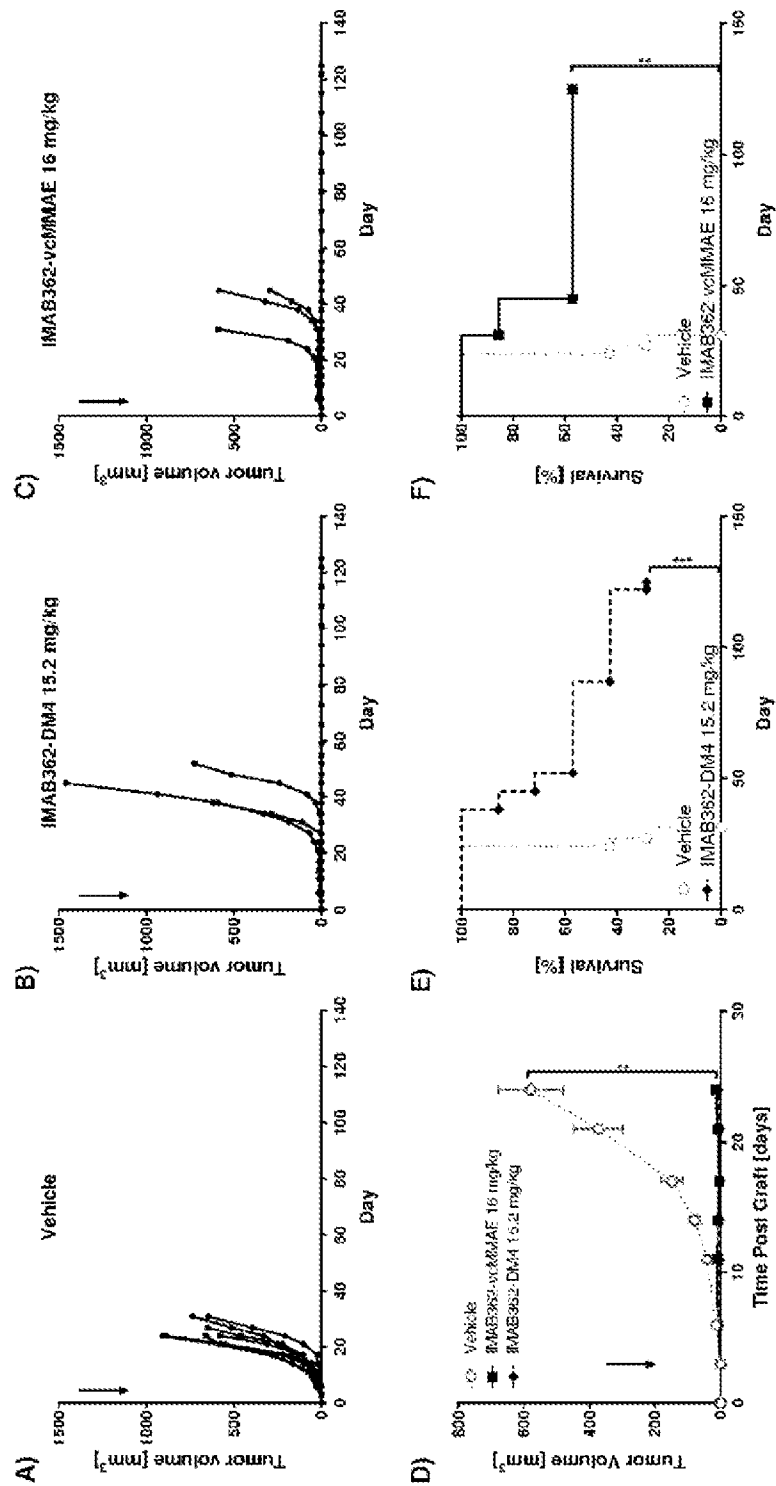
Vehicle = vehicul
Tumor volume = volum tumoral
Day = ziua
Survival = supraviețuire

Fig. 19



Vehicle = vehicul
 Tumor volume = volum tumoral
 Day = ziua
 Survival = supraviețuire

Fig. 20



Vehicle = vehicul
 Tumor volume = volum tumoral
 Day = ziua
 Survival = supraviețuire
 Time post graft (days) = timp post grefă (zile)

Fig. 21

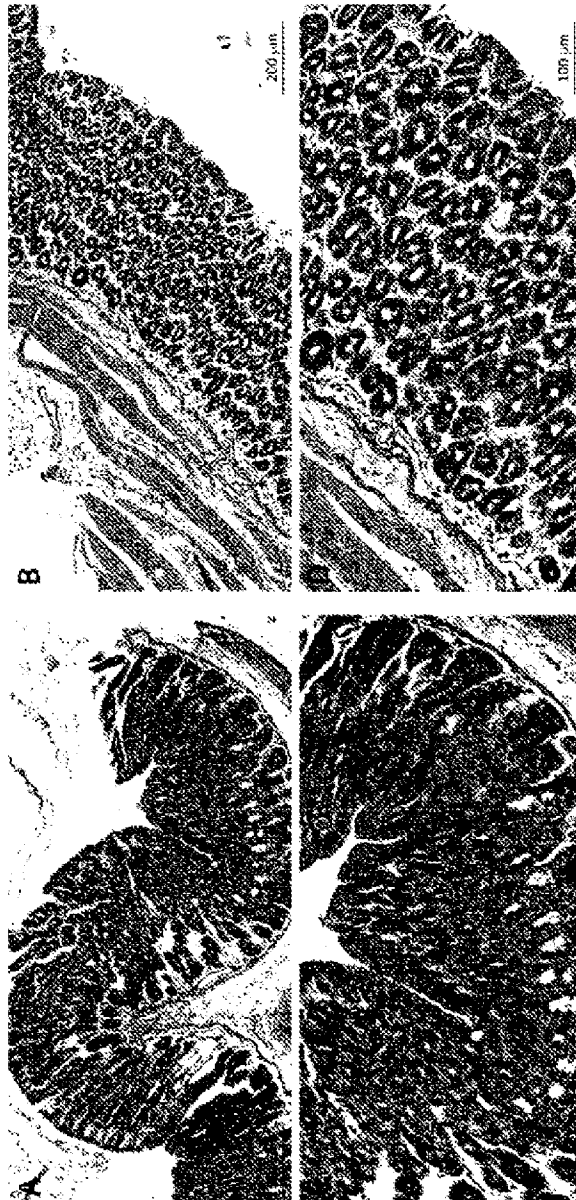


Fig. 22

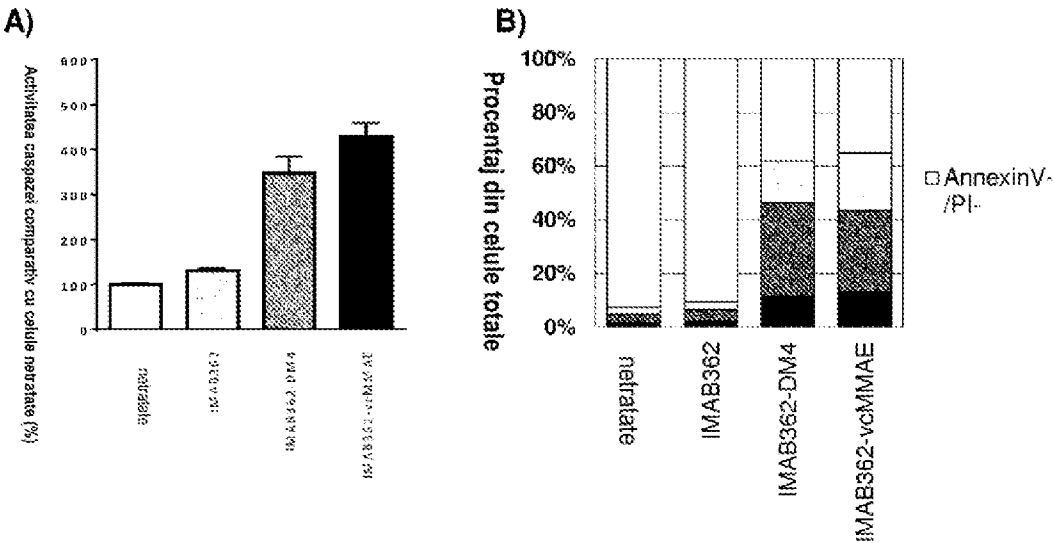
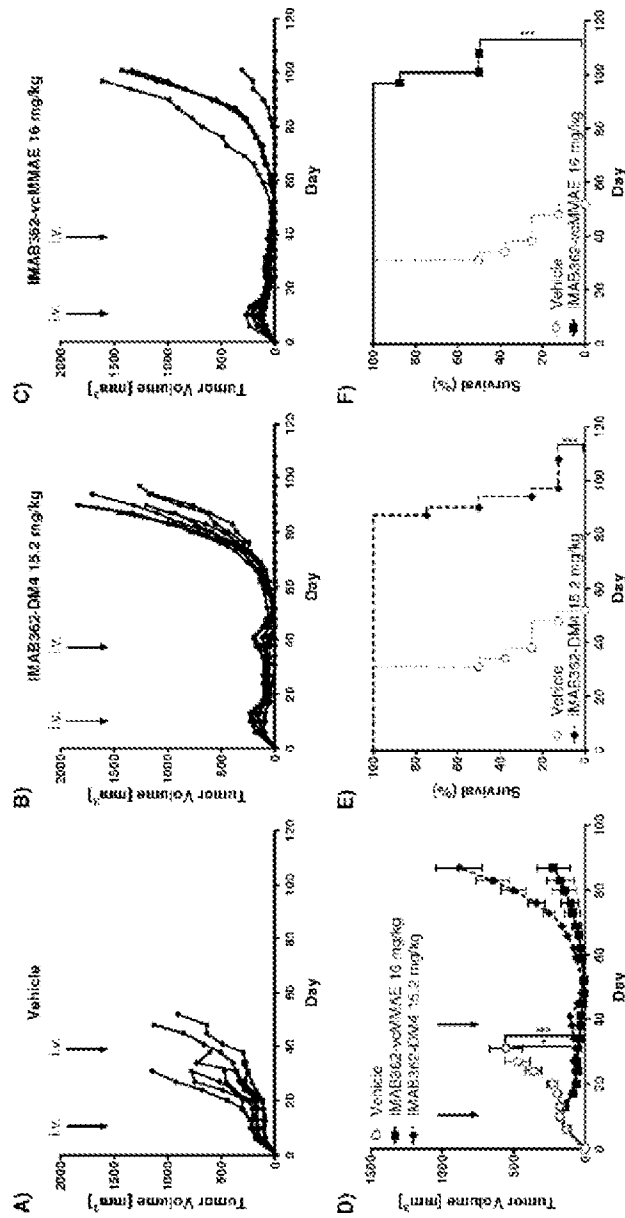


Fig. 23



Vehicle = vehicul
Tumor volume = volum tumoral
Day = ziua
Survival = supraviețuire

Fig. 24

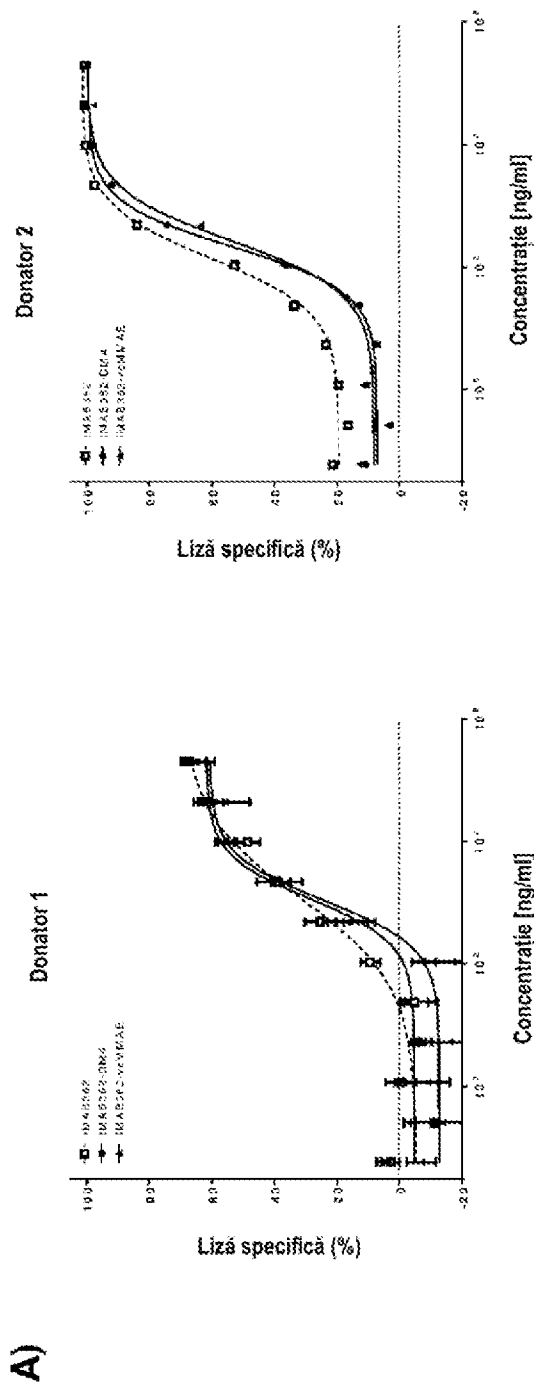
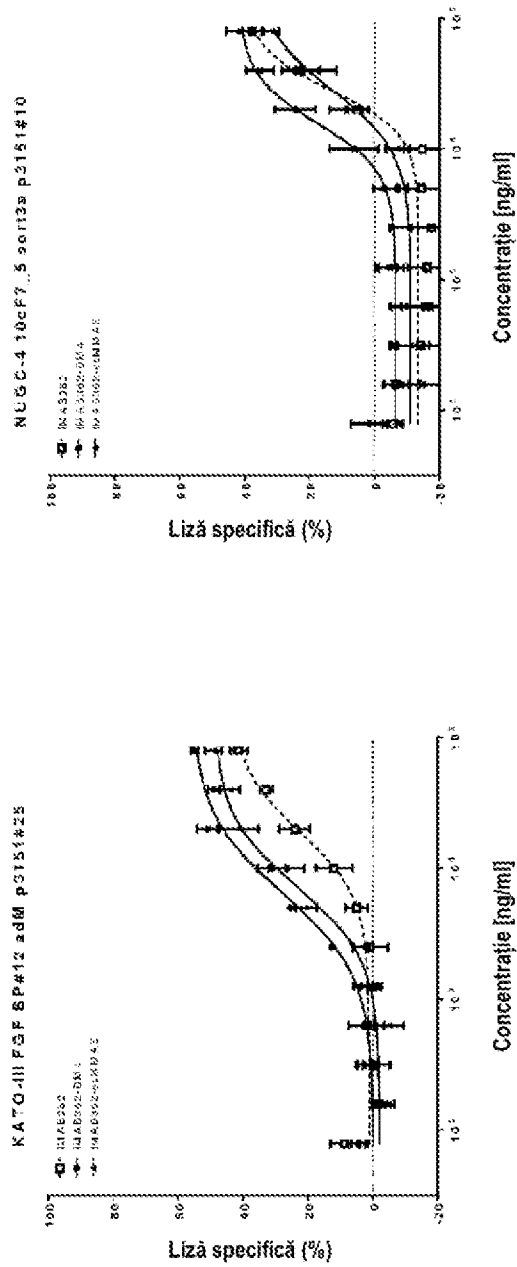


Fig. 25

A)



B)



Fig. 26