



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/39558 (2006.01); A61K 45/06 (2006.01); C07K 16/30 (2006.01); C07K 16/3046 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014152115, 21.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.05.2013

Дата регистрации:
04.09.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.05.2012 EP PCT/EP2012/002210

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2016 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 04.09.2018 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 23.12.2014

(86) Заявка РСТ:
EP 2013/001504 (21.05.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/174510 (28.11.2013)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

САХИН Угур (DE),
ТЮРЕЧИ Эзлем (DE),
МИТНАХТ-КРАУС Рита (DE),
ЯКОБС Штефан Денис (DE),
УЧ Магдалена Ядвига (DE),
ХЕЙНЦ Корнелиа Адриана Мария (DE),
СТАДЛЕР Кристиане Регина (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ГАНИМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ (DE),
ТРОН - ТРАНСЛАЦИОНАЛЕ
ОНКОЛОГИ АН ДЕР ЙОХАННЕС
ГУТЕНБЕРГ-УНИВЕРЗИТЕТ МАЙНЦ
ГЕМАЙННЮТЦИГЕ ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2445319 C2, 20.03.2012.

MOSCHELLA F. et al., Combination strategies for enhancing the efficacy of immunotherapy in cancer patients, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2010, p.169-178. SAHIN U. et al., Claudin-18 SpliceVariant 2 Is a Pan-Cancer Target Suitable for Therapeutic Antibody Development, Clin. Cancer Res., 2008, v.14, is.23, p.7624-7634. ZHANG T. (см. прод.)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К КЛАУДИНУ 18.2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу лечения или предотвращения раковых заболеваний, ассоциированных с экспрессией CLDN18.2, что может быть использовано в медицине. Способ представляет собой комбинированную терапию, включающую введение антител к CLDN18.2 и цитотоксических и/или цитостатических средств. Изобретение позволяет эффективно лечить или

предотвращать заболевания, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая раковые заболевания, такие как рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легких, рак яичников, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи, рак желчного пузыря и их метастазы. 3 н. и 36 з.п. ф-лы, 26 ил., 2 табл., 17 пр.

(56) (продолжение):

et al., Combination of Active Specific Immunotherapy or Adoptive Antibody or Lymphocyte Immunotherapy with Chemotherapy in the Treatment of Cancer, Cancer Immunol. Immunother., 2009, v.58, is.4, p.475-492. US 2012/0020989 A1, 26.01.2012. WO 2010/009794 A1, 28.01.2010.

R U 2 6 6 5 3 2 1 C 2

R U 2 6 6 5 3 2 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/39558 (2006.01); *A61K 45/06* (2006.01); *C07K 16/30* (2006.01); *C07K 16/3046* (2006.01)(21)(22) Application: **2014152115, 21.05.2013**(24) Effective date for property rights:
21.05.2013Registration date:
04.09.2018

Priority:

(30) Convention priority:
23.05.2012 EP PCT/EP2012/002210(43) Application published: **20.07.2016** Bull. № 20(45) Date of publication: **04.09.2018** Bull. № 25(85) Commencement of national phase: **23.12.2014**(86) PCT application:
EP 2013/001504 (21.05.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/174510 (28.11.2013)Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**SAKHIN Ugur (DE),
TYURECHI Ezlem (DE),
MITNAKHT-KRAUS Rita (DE),
YAKOBS Shtefan Denis (DE),
UCH Magdalena Yadviga (DE),
KHEJNTS Kornelia Adriana Mariya (DE),
STADLER Kristiane Regina (DE)**

(73) Proprietor(s):

**GANIMED FARMASYUTIKALZ AG (DE),
TRON - TRANSLATSIONALE ONKOLOGI
AN DER JOKHANNES
GUTENBERG-UNIVERZITET MAJNTS
GEMAJNNYUTTSIGE GMBKH (DE)**(54) **COMBINED THERAPY USING THE ANTIBODIES TO CLAUDIN 18.2 FOR TREATMENT OF CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to the method of treating or preventing cancers, which are associated with the expression of CLDN18.2, it can be used in medicine. Method is a combination therapy comprising administration of antibodies to CLDN18.2 and cytotoxic and/or cytotoxic agents.

EFFECT: invention allows to effectively treat or prevent diseases, which are associated with the cells expressing CLDN18.2, including cancer diseases, such as gastric cancer, esophageal cancer, pancreatic cancer, lung cancer, ovarian cancer, colon cancer, liver cancer, head and neck cancer, gall bladder cancer and their metastases.

39 cl, 26 dwg, 2 tbl, 17 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение предоставляет комбинированную терапию для эффективного лечения и/или предотвращения заболеваний, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая раковые заболевания, такие как рак желудка, рак пищевода, рак 5 поджелудочной железы, рак легких, рак яичников, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи, рак желчного пузыря и их метастазы.

Уровень техники

Рак желудка и пищевода (гатроэзофагеальные раки; GE) принадлежат к числу злокачественных новообразований, с которыми связана самая высокая нереализованная 10 потребность медицины. Рак желудка является второй причиной смерти от рака во всем мире. Частота случаев возникновения эзофагеального рака увеличилась за последние десятилетия, совпадая с изменением гистологического типа и первичной локализации опухоли. В настоящее время аденокарцинома пищевода является более 15 распространенной в Соединенных штатах и западной Европе, чем плоскоклеточная карцинома, при этом большинство опухолей располагается в дистальном пищеводе. Уровень общей 5-летней выживаемости для GE рака составляет 20-25%, несмотря на агрессивность установленного стандартного лечения, связанного с существенными побочными эффектами.

У большинства пациентов обнаруживается местнораспространенная или 20 метастазирующая опухоль, после чего они подвергаются первой линии химиотерапии. Режимы лечения, основанные на сочетании платины и производных фторпиримидина, обычно комбинируют с третьим соединением (например, таксаном или антрациклинами). Однако, медиана выживаемости без прогрессирования от 5 до 7 месяцев и средняя 25 общей выживаемости от 9 до 11 месяцев - это самое лучшее, что можно ожидать.

Отсутствие существенной пользы от различных режимов комбинированной 30 химиотерапии нового поколения в отношении этих видов рака стимулировало исследования, связанные с использованием таргентных (нацеленных на мишень) препаратов. В последнее время для лечения Her2/neu-положительных гастрэзофагеальных видов рака был одобрен трастузумаб. Однако данный вид лечения 35 подходит только -20% пациентов, у которых экспрессируется данная мишень, поэтому потребность медицины в препаратах остается по-прежнему высокой.

Молекула плотных контактов клаудин 18 сплайс-варианта 2 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)) является членом семейства белков клаудина - белков плотных контактов. CLDN18.2 представляет собой трансмембранный белок (27.8 kDa), содержащий четыре 40 трансмембранных домена с двумя небольшими внеклеточными петлями.

В нормальных тканях отсутствует обнаруживаемая посредством RT-PCR экспрессия CLDN18.2, за исключением желудка. Проведение иммуногистохимического анализа с помощью CLDN18.2-специфических антител показывает, что желудок является 45 единственной положительной тканью в отношении этого белка.

CLDN18.2 является высокоселективным гастральным антигеном, экспрессируемым исключительно на короткоживущих дифференцированных эпителиальных клетках желудка. CLDN18.2 сохраняется в ходе злокачественной трансформации, и поэтому часто обнаруживается на поверхности клеток рака желудка человека. Более того, этот пан-опухолевый антиген эктопически активирован на значимых уровнях в 45 аденокарциномах пищевода, поджелудочной железы и легких. Белок CLDN18.2 также локализуется в метастазах аденокарциномы желудка в лимфатических узлах и в отдаленных метастазах, в частности, в яичниках (так называемая опухоль Крукенберга).

Химерное IgG1 антитело IMAB362, направленное против CLDN18.2, было

разработано компанией Ganymed Pharmaceuticals AG. IMAB362 распознает первый внеклеточный домен (ECD1) CLDN18.2 с высокой аффинностью и специфичностью. IMAB362 не связывается с каким-либо другим членом семейства клаудинов, включая близкородственный сплайс-вариант 1 клаудина 18 (CLDN18.1). IMAB362 демонстрирует узкую специфичность к опухолевым клеткам и сочетает в себе четыре независимых высокоактивных механизма действия. После связывания с мишенью IMAB362 опосредует уничтожение клеток с помощью ADCC, CDC и индукции апоптоза, вызванного перекрестным связыванием мишени на поверхности опухолевой клетки, и прямого ингибирования пролиферации. Таким образом, IMAB362 эффективно вызывает лизис CLDN18.2-положительных клеток, включая линию клеток рака желудка человека *in vitro* и *in vivo*. У мышей, несущих CLDN18.2-положительную линию клеток рака, наблюдается благоприятное действие на выживаемость, и вплоть до 40% мышей демонстрирует регрессию опухоли при лечении IMAB362.

Токсичность и РК/ТК профиль IMAB362 были тщательно исследованы на мышах и яванских макаках (*супомолгус*), включая определение диапазона доз, 28-дневное исследование токсичности многократного применения препарата на макаках и 3-месячное исследование токсичности многократного применения препарата на мышах. Было показано, что при внутривенном введении (*i.v.*) многократные дозы IMAB362 хорошо переносятся и мышами (самая большая продолжительность еженедельного введения 3 месяца, самый высокий уровень доз 400 мг/кг) и яванскими макаками (до 5 еженедельных применений вплоть до 100 мг/кг). Не выявлено признаков системной или местной токсичности. В частности, ни в одном исследовании токсичности не наблюдалось токсического действия на желудок. IMAB362 не вызывает активацию иммунитета и высвобождение цитокинов. Не было отмечено неблагоприятных эффектов на репродуктивные органы самцов или самок. IMAB362 не связывается с тканями, не имеющими мишени. Исследование биораспределения на мышах показало, что причиной отсутствия гастральной токсичности вероятнее всего является компартментализация плотных контактов в месте просвета в здоровом эпителии желудка, которая, по-видимому, значительно уменьшает доступность IMAB362 эпитопа. Эта компартментализация пропадает после злокачественной трансформации, что приводит эпитоп в состояние, поддающееся воздействию IMAB362.

ЕМАВ362 находится на ранней стадии клинических испытаний. Фаза I клинических испытаний проводится на людях. 5 дозовых групп (33 мг/м², 100 мг/м², 300 мг/м², 600 мг/м², 1000 мг/м²) по 3 пациента в каждой получали одно внутривенное введение IMAB362, наблюдение проводили в течение 28 дней. IMAB362 хорошо переносился, при этом не проводилось соответствующего исследования безопасности для пациентов. У одного пациента все измеренные опухолевые маркеры были значительно понижены в пределах 4 недель после лечения. В продолжающейся фазе IIa клинических исследований IMAB362 назначается повторно.

В данном документе мы предоставляем результаты, демонстрирующие, что химиотерапевтические средства могут стабилизировать или увеличивать экспрессию CLDN18.2 на поверхности раковых клеток, что приводит к повышению доступности CLDN18.2 для анти-CLDN18.2 антитела, такого как IMAB362. Наблюдалось синергическое действие анти-CLDN18.2 антитела, такого как IMAB362, с определенными химиотерапевтическими режимами, в частности, химиотерапевтическими режимами, используемыми при лечении рака желудка или лечении солидных опухолей человека. Клетки рака человека, предварительно обработанные химиотерапевтическими средствами, являются более подверженными лизису, индуцированному мишень-

специфическим антителом. На мышинных опухолевых моделях подавление опухоли с использованием анти-CLDN18.2 антитела в сочетании с химиотерапией превосходит применение анти-CLDN18.2 антитела в виде монотерапии.

Кроме того, представленные здесь данные показывают, что бисфосфонаты, такие как золендроновая кислота (ZA), в частности при введении в сочетании с рекомбинантным интерлейкином-2 (IL-2), дополнительно увеличивают активность анти-CLDN18.2 антитела, такого как IMAB362. Основным механизмом является активация и размножение высокоцитотоксической популяции иммунных клеток (γ 982 Т-клетки).

Раскрытие изобретения

В общем, настоящее изобретение предоставляет комбинированную терапию для эффективного лечения и/или предотвращения заболеваний, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая раковые заболевания, такие как рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легких, такой как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи, рак желчного пузыря и их метастазы, в частности, метастазы рака желудка, такие как опухоль Крукенберга, метастазы в брюшину и/или лимфатические узлы. В частности, предпочтительными раковыми заболеваниями являются аденокарциномы желудка, пищевода, протока поджелудочной железы, желчевыводящих путей, легких и яичников.

В одном аспекте настоящее изобретение предоставляет способ лечения или предотвращения ракового заболевания, включающий введение пациенту антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, в комбинации со средством, стабилизирующим или увеличивающим экспрессию CLDN18.2. Экспрессия CLDN18.2 предпочтительно происходит на поверхности раковой клетки. Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может быть введено до, одновременно с или после введения антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, или его комбинации.

Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может быть цитотоксическим и/или цитостатическим средством. В одном варианте осуществления средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, включает средство, вызывающее остановку клеточного цикла или накопление клеток в одной или более фазах клеточного цикла, предпочтительно в одной или более фазах клеточного цикла, отличных от G1-фазы. Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может включать препарат, выбранный из группы, состоящей из антрациклинов, соединений платины, аналогов нуклеозидов, таксанов и аналогов камптотецина или его пролекарств, и их комбинаций. Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может включать препарат, выбранный из группы, состоящей из эпирубина, оксалиплатина, цисплатина, 5-фторурацила или его пролекарств, таких как капецитабин, доцетаксел, иринотекан, и их комбинаций.

Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может включать комбинацию оксалиплатина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию цисплатина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и оксалиплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и цисплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и оксалиплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и цисплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и 5-фторурацила или его пролекарств, или комбинацию, по меньшей мере, одного аналога камптотецина и 5-фторурацила или

его пролекарств. Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может быть средством, вызывающим иммуногенную гибель клеток. Средство, вызывающее иммуногенную гибель клеток, может включать средство, выбранное из группы, состоящей из антрациклинов, оксалиплатина и их комбинаций. Средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может включать комбинацию эпирубина и оксалиплатина. В одном варианте осуществления способ изобретения включает введение, по меньшей мере, одного антрациклина, по меньшей мере, одного соединения платины и, по меньшей мере, одного 5-фторурацила и его пролекарств. Антрациклин можно выбрать из группы, состоящей из эпирубина, доксорубина, даунорубина, идарубина и валрубина. Предпочтительно, антрациклин является эпирубином. Соединение платины можно выбрать из группы, состоящей из оксалиплатина и цисплатина. Нуклеозидный аналог может быть выбран из группы, состоящей из 5-фторурацила и его пролекарства. Таксан можно выбрать из группы, состоящей из доцетаксела и паклитаксела. Аналог камптотецина может быть выбран из группы, состоящей из иринотекана и топотекана. В одном варианте осуществления способ изобретения включает введение (i) эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила, (ii) эпирубина, оксалиплатина и капецитабина, (iii) эпирубина, цисплатина и 5-фторурацила, (iv) эпирубина, цисплатина и капецитабина, или (v) фолиниевой кислоты, оксалиплатина и 5-фторурацила.

В одном варианте осуществления способ изобретения дополнительно включает введение средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки являются $V\gamma9V\delta2$ Т-клетками. В одном варианте осуществления средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, является бисфосфонатом, таким как азотсодержащий бисфосфонат (аминобисфосфонат). В одном варианте осуществления средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, выбирают из группы, состоящей из золедроновой кислоты, клодроновой кислоты, ибандроновой кислоты, памидроновой кислоты, ризедроновой кислоты, минодроновой кислоты, олпаддроновой кислоты, алендроновой кислоты, инкадроновой кислоты и их солей. В одном варианте осуществления средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, вводят в комбинации с интерлейкином-2.

Способ изобретения может дополнительно включать введение, по меньшей мере, одного дополнительного химиотерапевтического средства, которое может быть цитотоксическим средством.

Антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, может связываться с нативными эпитопами CLDN18.2, присутствующими на поверхности живых клеток.

В одном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с первой внеклеточной петлей CLDN18.2. В одном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, опосредует уничтожение клетки с помощью одного или более из числа опосредованного комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) лизиса, опосредованного

антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (ADCC) лизиса, индукции апоптоза и ингибирования пролиферации. В одном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является моноклональным, химерным или гуманизированным антителом или фрагментом антитела. В одном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является антителом, выбранным из группы, состоящей из (i) антитела, продуцированного и/или полученного от клона, депонированного под учетным номером DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM

ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 или DSM ACC2810, (ii) антитела, которое является химерной или гуманизированной формой антитела согласно (i), (iii) антитела, обладающего специфичностью антитела согласно (i) и (iv) антитела, содержащего антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающий сайт, в частности, варибельную область, антитела согласно (i) и предпочтительно обладающего специфичностью антитела согласно (i). В одном варианте осуществления антитело соединено с терапевтическим средством, таким как токсин, радиоизотоп, лекарственное средство или цитотоксическое средство.

В одном варианте осуществления способ изобретения включает введение антитела, обладающего способностью связывания с CLDN18.2, в дозе вплоть до 1000 мг/м^2 . В одном варианте осуществления способ изобретения включает введение антитела, обладающего способностью связывания с CLDN18.2, повторно в дозе от 300 до 600 мг/м^2 .

В одном варианте осуществления рак является CLDN18.2-положительным. В одном варианте осуществления раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичников, рака толстой кишки, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и их метастазов. Раковое заболевание может быть опухолью Крукенберга, метастазами в брюшину и/или лимфатические узлы. В одном варианте осуществления рак представляет собой аденокарциному, в частности, прогрессирующую аденокарциному. В одном варианте осуществления рак выбирают из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, в частности, нижнего отдела пищевода, рака гастроэзофагиального соединения и гастроэзофагиального рака. Пациент может быть пациентом с отрицательным статусом по HER2/neu или пациентом с положительным статусом по HER2/neu, но не подходящим для лечения трастузумабом.

Согласно изобретению, CLDN18.2 предпочтительно имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предоставляет медицинский препарат, содержащий антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, и средство, стабилизирующее и увеличивающее экспрессию CLDN18.2. Медицинский препарат настоящего изобретения может дополнительно включать средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки. Антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, и средство, стабилизирующее и увеличивающее экспрессию CLDN18.2, и необязательно средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, могут присутствовать в медицинском препарате в виде смеси или отдельно друг от друга. Медицинский препарат может представлять собой набор, включающий первый контейнер, содержащий антитело, обладающее способностью связывания с CLDN18.2 и контейнер, содержащий средство, стабилизирующее и увеличивающее экспрессию CLDN18.2, и необязательно контейнер, содержащий средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки. Медицинский препарат может дополнительно включать напечатанные инструкции по применению препарата для лечения рака, в частности, для применения препарата в способе изобретения. Различными вариантами осуществления медицинского препарата и, в частности, средства, стабилизирующего и увеличивающего экспрессию CLDN18.2, и средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки, являются описанные выше в отношении способа изобретения.

Настоящее изобретение также предоставляет описанные здесь средства, такие как антитело, обладающее способностью связывания с CLDN18.2, для применения в описанных здесь способах, например, для введения в комбинации со средством,

стабилизирующим или увеличивающим экспрессию CLDN18.2, и необязательно средством, стимулирующим $\gamma\delta$ Т-клетки.

Другие признаки и преимущества данного изобретения станут понятны из следующего подробного описания и пунктов формулы изобретения.

5 Краткое описание чертежей

Фигура 1. Действие химиотерапии на клетки рака желудка. Культивирование клеток KatoIII в течение 96 часов приводит к остановке клеточного цикла в G0/G1-фазе и отрицательной регуляции CLDN18.2. Цитостатические соединения, вызывающие остановку клеточного цикла в разных фазах клеточного цикла (S-фаза (5-FU) или G2-фаза (эпирубицин)), стабилизируют CLDN18.2-экспрессию.

Фигура 2. Действие химиотерапии на клетки рака желудка. а/б: Действие химиотерапии на уровне транскрипта и белка CLDN18.2 в клетках рака желудка, с: Результаты исследования с помощью проточной цитометрии внеклеточного связывания IMAB362 на клетках рака желудка, обработанных химиотерапевтическими средствами.

15 Фигура 3. Действие химиотерапии на клетки рака желудка. Цитостатические соединения, вызывающие остановку клеточного цикла в разных фазах клеточного цикла (S/G2-фаза (иринотекан) или G2-фаза (доцетаксел)).

Фигура 4. IMAB362-индуцированный ADCC опосредует уничтожение клеток рака желудка после предварительной обработки химиотерапевтическими средствами.

20 Фигура 5. Действие химиотерапии на клетки рака желудка, а: Клетки, обработанные иринотеканом, доцетакселем или цисплатином демонстрируют более низкий уровень жизнеспособных клеток по сравнению с клетками, культивированными в среде, б: CLDN18.2 экспрессия в клетках, обработанных иринотеканом, доцетакселем или цисплатином, является повышенной по сравнению с клетками, культивированными в среде, с/д: Обработка клеток иринотеканом, доцетакселем или цисплатином увеличивает потенциальную возможность IMAB362 вызывать ADCC.

Фигура 6. Эффекты химиотерапии на CDC, индуцированный IMAB362.

Фигура 7. Эффекты химиотерапии на эффекторные клетки.

Фигура 8. Размножение PBMC в культурах с добавлением ZA/IL-2.

30 Фигура 9. Обогащение $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток в PBMC культурах с добавлением ZA/IL-2.

Фигура 10. Обогащение $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток в среде с добавлением ZA и увеличивающейся дозы IL-2.

Фигура 11. Размножение и цитотоксическая активность $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток после совместной инкубации с ZA-активированными моноцитами и клетками рака человека.

35 Фигура 12. ZA-зависимое развитие различных типов клеток в PBMC-культурах.

Фигура 13. Поверхностные маркеры на $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетках после ZA/IL-2 обработки.

Фигура 14. ADCC активность $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток в сочетании с IMAB362 на CLDN18.2-положительных NUGC-4 клетках рака желудка.

40 Фигура 15. ADCC активность IMAB362 с использованием $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток в качестве эффекторных клеток.

Фигура 16. Действие ZA на поверхностное расположение CLDN18.2 на клетках-мишенях.

Фигура 17. Эффекты химиотерапии и ZA/IL-2-обработки на эффекторные клетки.

Фигура 18. Исследование биораспределения конъюгированных антител у мышей.

45 Фигура 19. Раннее лечение HEK293~CLDN18.2 ксенотрансплантов опухоли.

Фигура 20. Лечение развитых HEK293~CLDN18.2 ксенотрансплантов опухоли.

Фигура 21. Действие IMAB362 на рост подкожных ксенотрансплантов рака желудка.

Фигура 22. Эффекты иммунотерапии IMAB362 на NCI-N87~CLDN18.2

ксенотранспланты карциномы желудка.

Фигура 23. Эффекты комбинированной терапии ГМАВ362 и режима EOF на NCI-N87~CLDN18.2 ксенотранспланты.

Фигура 24. Эффекты комбинированной терапии ИМАВ362 и EOF режима на NUGC-4~CLDN18.2 ксенотранспланты.

Фигура 25. Действие ZА/IL-2-индуцированных Vγ9Vδ2 Т-клеток на контроль макроскопических опухолей с использованием ИМАВ362 у мышей NSG.

Фигура 26. Эффекты комбинированной терапии ИМАВ362 и EOF режима на CLS-103~cldn18.2 аллотрансплантаты опухолей.

Осуществление изобретения

Несмотря на то, что настоящее изобретение подробно описано далее, понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными методиками, протоколами и реагентами, описанными здесь, поскольку они могут отличаться. Также следует понимать, что использованная в описании терминология предназначена только для описания отдельных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничиваться только прилагаемыми пунктами формулы изобретения. Если не указано иначе, все технические и научные термины, использованные в описании, имеют те же самые значения, которые обычно понятны среднему специалисту в данной области техники.

В дальнейшем будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечисляются в конкретных вариантах осуществления, однако, должно быть понятно, что они могут объединяться любым образом и в любом количестве для создания дополнительных вариантов осуществления. Различным образом описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления не должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение только точно описанными вариантами осуществления. Следует понимать, что это описание поддерживает и рассматривает варианты осуществления, которые объединяют точно описанные варианты осуществления с любым числом раскрытых и/или предпочтительных элементов. Более того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в этой заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки, если не оговорено иное.

Предпочтительно, использованные в описании термины определяются так, как описано в "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, и H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

При осуществлении настоящего изобретения используются, если не указано иначе, обычные методы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и методы рекомбинантных ДНК, которые объясняются в литературе, посвященной данной области техники (смотри, например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

На всем протяжении этого подробного описания и последующих пунктов формулы изобретения, если контекст не требует иного, следует понимать, что слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", предполагает включение определенного члена, целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий, а не исключение любого другого члена, целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий, хотя в некоторых вариантах осуществления такой другой член, целое число или стадия или группа членов, целых чисел или стадий может исключаться, т.е. объект изобретения заключается во включении установленного члена,

целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий. Термины "a" и "an" и "the" и подобные ссылки, использованные в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) следует истолковывать как включающие и единственное и множественное число, если в описании не указано иначе или иное явно не продиктовано контекстом. Перечисление пределов значений в описании служит только как способ сокращения упоминания в отдельности каждого отдельного значения, попадающего в предел. Если не указано иное, каждое индивидуальное значение включается в подробное описание, как если бы оно было отдельно перечислено в описании. Все описанные здесь методы могут осуществляться в любом подходящем порядке, если в описании не указано иначе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или характерных выражений (например, "такой как"), предоставленных в описании, предназначается только для лучшей иллюстрации изобретения и не ограничивает рамки изобретения, заявленные в иной форме. Формулировки подробного описания не должны быть истолкованы, как означающие какой-либо незаявленный элемент, существенный для осуществления изобретения на практике.

На протяжении текста данной заявки процитировано несколько документов. Каждый из приведенных в описании документов (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, полностью включается в описание путем отсылки. Ничто в описании не следует рассматривать как допущение, что изобретение не имеет права датировать такое раскрытие в соответствии с предшествующим изобретением.

Термин "CLDN18" относится к клаудину 18 и включает любые варианты, включая клаудин 18 сплайс-вариант 1 (клаудин 18.1 (CLDN18.1)) и клаудин 18 сплайс-вариант 2 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)).

Термин "CLDN18.2" предпочтительно имеет отношение к человеческому CLDN18.2 и, в частности, к белку, содержащему, предпочтительно состоящему из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 из списка последовательностей или варианта указанной аминокислотной последовательности.

Термин "CLDN18.1" предпочтительно имеет отношение к человеческому CLDN18.1 и, в частности, к белку, содержащему, предпочтительно состоящему из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 2 из списка последовательностей или варианта указанной аминокислотной последовательности.

Термин "вариант" согласно изобретению имеет отношение, в частности, к мутантам, сплайс-вариантам, изоформам, аллельным вариантам, видовым вариантам и видовым гомологам, в частности, имеющимся в природе. Аллельный вариант имеет отношение к изменению в нормальной последовательности гена, значение которого часто непонятно. Полное генетическое секвенирование часто устанавливает многочисленные аллельные варианты для данного гена. Видовым гомологом является последовательность нуклеиновых кислот или аминокислот, происходящая от другого вида, отличающегося от вида происхождения данной последовательности нуклеиновых кислот или аминокислот. Термин "вариант" будет включать любые посттрансляционно модифицированные варианты и конформационные варианты.

Согласно изобретению термин "CLDN18.2-положительный рак" означает рак с участием раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2, предпочтительно на поверхности указанных раковых клеток.

Термин "поверхность клетки" используется в соответствии с его обычным значением в данной области, и таким образом включает внешнюю поверхность клетки, доступную

для связывания с белками и другими молекулами.

CLDN18.2 экспрессируется на поверхности клеток в том случае, если он располагается на поверхности указанных клеток, и является доступным для связывания CLDN18.2-специфическими антителами при добавлении их к клеткам.

5 Согласно изобретению, CLDN18.2 является незначительно экспрессированным в клетке, если уровень экспрессии является более низким по сравнению с экспрессией в клетках желудка или ткани желудка. Предпочтительно, уровень экспрессии составляет менее чем 10%, предпочтительно менее чем 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% или 0.05% экспрессии в клетках желудка или ткани желудка или даже ниже. Предпочтительно, 10 CLDN18.2 является незначительно экспрессированным в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в нераковой ткани, отличной от ткани желудка, не больше, чем в 2 раза, предпочтительно в 1,5 раза, и предпочтительно не превышает уровень экспрессии в указанной нераковой ткани. Предпочтительно, CLDN18.2 является незначительно экспрессированным в клетке, если уровень экспрессии ниже предела 15 обнаружения, и/или если уровень экспрессии является слишком низким, чтобы обеспечить возможность связывания CLDN18.2-специфическими антителами при добавлении их к клеткам.

Согласно изобретению CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в нераковой ткани, отличной от ткани желудка, 20 предпочтительно более, чем в 2 раза, предпочтительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз или в 10000 раз. Предпочтительно, CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии выше предела обнаружения, и/или если уровень экспрессии является достаточно высоким, чтобы обеспечить возможность связывания CLDN18.2-специфическими антителами при добавлении их к клеткам. Предпочтительно, 25 экспрессированный в клетке CLDN18.2 экспрессируется или экспонируется на поверхности указанной клетки.

Согласно изобретению термин "болезнь" относится к любому патологическому состоянию, включая рак, в частности, к описанным в данном документе формам рака. Любые упоминания рака или конкретные формы рака в данном документе также 30 включают его метастазы. В предпочтительном варианте осуществления болезнь, которую необходимо лечить в соответствии с настоящей заявкой, затрагивает клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

"Болезни, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2", или сходные выражения означают согласно изобретению, что CLDN18.2 экспрессируется в клетках 35 больной ткани или органа. В одном варианте осуществления экспрессия CLDN18.2 в клетках больной ткани или органа является повышенной по сравнению с состоянием в здоровой ткани или органе. Повышение имеет в виду повышение, по меньшей мере, на 10%, в частности, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 100%, по меньшей мере, на 200%, по меньшей мере, на 500%, по меньшей мере, 40 на 1000%, по меньшей мере, на 10000% или даже более. В одном варианте осуществления экспрессия обнаружена только в больной ткани, тогда как экспрессия в здоровой ткани подавлена. Согласно изобретению, болезни, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включают раковые заболевания. Кроме того, согласно изобретению раковыми заболеваниями предпочтительно являются те, в которых раковые клетки 45 экспрессируют CLDN18.2.

При использовании в описании термин "раковая болезнь" или "рак" включает болезнь, характеризующуюся неправильно регулируемым клеточным ростом, пролиферацией, дифференцировкой, адгезией и/или миграцией. Под "раковой клеткой" имеется в виду

аномальная клетка, которая растет посредством быстрой, неконтролируемой клеточной пролиферации и продолжает расти после стимула (воздействия), инициирующего прекращение нового роста. Предпочтительно "раковая болезнь" характеризуется

клетками, экспрессирующими CLDN18.2, а раковая клетка экспрессирует CLDN18.2.

Клетка, экспрессирующая CLDN18.2, предпочтительно является раковой клеткой, предпочтительно описанных здесь видов раков.

"Аденокарцинома" представляет собой рак, возникающий в железистой ткани. Эта ткань к тому же является частью большой группы тканей, известных как эпителиальная

ткань. Эпителиальная ткань включает кожу, железы и целый ряд других тканей, выстилающих полости и органы тела. С точки зрения эмбриологии эпителий происходит

из эктодермы, энтодермы и мезодермы. Чтобы относиться к аденокарциноме, клетки необязательно должны быть частью железы, при условии, что они обладают секреторными свойствами. Эта форма карциномы может возникать у некоторых высших

животных, включая людей. Хорошо дифференцированные аденокарциномы имеют тенденцию походить на железистую ткань, из которой они происходят, в то время как

плохо дифференцированные могут не походить на железистую ткань. С помощью окрашивания клеток, полученных из биопсийного материала, патолог определяет, является ли опухоль аденокарциномой или другим типом рака. Аденокарциномы могут

возникать во многих тканях организма вследствие повсеместного распространения желез в организме. Наряду с тем, что каждая железа не может секретировать одно и

то же вещество, когда у клетки существует внешнесекреторная функция, она считается железистой, и поэтому ее злокачественная форма называется аденокарциномой. Злокачественные аденокарциномы вторгаются в другие ткани и дают метастазы, также

проникающие в другие ткани. Аденокарцинома яичника является наиболее распространенным типом карциномы яичника. Сюда включаются серозные и слизистые аденокарциномы, светлоклеточная аденокарцинома и эндометриоидная аденокарцинома.

Под "метастазированием" имеется в виду распространение раковых клеток из первоначального местоположения в другую часть организма. Образование метастаза

является очень сложным процессом и зависит от отделения злокачественных клеток от первичной опухоли, вторжения (инвазии) во внеклеточный матрикс, проникновения в

эндотелиальные базальные мембраны для проникновения в полость тела и сосудов, а затем, после транспортировки кровотоком, инфильтрации в органы-мишени. Наконец, рост новой опухоли в месте-мишени зависит от ангиогенеза. Метастазы опухоли могут

возникать даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут остаться и развить метастатический потенциал. В одном варианте

осуществления термин "метастаз" согласно изобретению имеет отношение к "отдаленному метастазу", т.е. метастазу, удаленному от первичной опухоли и системы

региональных лимфатических узлов. В одном варианте осуществления термин "метастаз" согласно изобретению относится к метастазу в лимфатический узел. Одной конкретной

формой метастаза, который поддается лечению с помощью терапии изобретения, является метастаз, берущий начало от рака желудка как первичного очага. В

предпочтительных вариантах осуществления такой метастаз рака желудка является опухолью Крукенберга, метастазами в брюшину и/или метастазами в лимфатические узлы.

Опухоль Крукенберга является редкой метастатической опухолью яичника, насчитывающей от 1% до 2% от всех опухолей яичника. Прогноз опухоли Крукенберга

остается плохим, при этом не существует общепринятого лечения для опухоли Крукенберга. Опухоль Крукенберга является метастатической перстневидноклеточной

аденокарциномой яичника. Желудок является первичным очагом для большинства случаев опухоли Крукенберга (70%). Карциномы толстой кишки, аппендикса и молочной железы (в основном инвазивная дольковая карцинома) являются следующими самыми распространенными первичными локализациями. Сообщалось о единичных случаях
 5 опухоли Крукенберга, происходящих из карциномы желчного пузыря, желчных протоков, поджелудочной железы, тонкого кишечника, Фатерова сосочка, шейки матки и мочевого пузыря/мочевого протока. Интервал между постановкой диагноза первичной карциномы и последующим обнаружением поражения яичника составляет обычно 6 месяцев или меньше, однако сообщалось и о более длительных сроках. Во многих
 10 случаях, первичная опухоль является очень маленькой и может остаться незамеченной. Предшествующая карцинома желудка или другого органа в анамнезе наблюдается только в 20%-30% случаев.

Опухоль Крукенберга является примером селективного распространения рака, чаще всего в направлении желудок - яичник. Эта «ось» распространения опухоли исторически
 15 привлекает внимание многих патоморфологов, в частности, когда было обнаружено, что новообразования в желудке селективно метастазируют в яичники, не задевая другие ткани. Путь метастазов карциномы желудка в яичники был загадкой в течение длительного времени, однако теперь очевидно, что ретроградное распространение по лимфатическим сосудам представляет собой наиболее вероятный путь метастазирования.

Опухоли Крукенберга появляются у молодых женщин, что необычно для пациентов с метастатической карциномой, которая наблюдается в большинстве случаев на пятом
 20 десятке жизни, со средним возрастом 45 лет. Этот ранний возраст распространения может быть отчасти связан с повышенной частотой случаев перстневидноклеточной карциномы желудка у молодых женщин. Часто встречающиеся симптомы, как правило, связаны с вовлечением в процесс яичников, наиболее распространенными из которых
 25 являются боль в животе и вздутие живота (в основном вследствие двусторонней большой массы яичников). У остальной части пациентов наблюдаются неспецифические желудочно-кишечные симптомы или симптомы отсутствуют. В дополнение к этому, опухоль Крукенберга по имеющимся данным связана с маскулинизацией, являющейся
 30 результатом выработки гормонов стромы яичников. В 50% случаев у пациентов имеется асцит, обычно содержащий злокачественные клетки.

Опухоль Крукенберга является двусторонней более чем в 80% сообщенных случаев. Как правило, яичники увеличены асимметрично и имеют бугристый контур. Поверхности срезов желтого или белого цвета; обычно это солидные опухоли, хотя иногда являются
 35 кистовидными. Что важно, поверхность капсулы яичников с опухолью Крукенберга в большинстве случаев гладкая и не имеет спаек или брюшинных отложений. Следует отметить, что другие метастатические опухоли в яичник, как правило, связаны с поверхностными имплантатами. Это может объяснять, почему макроскопическое патоморфологическое исследование опухоли Крукенберга может производить
 40 обманчивое впечатление первичной опухоли яичника. Однако, двусторонняя симметрия опухоли Крукенберга находится в соответствии с его метастатической природой.

Следует отметить высокий процент общей летальности среди пациентов с опухолью Крукенберга. Большинство пациентов умирает в течение 2 лет (медиана выживаемости 14 месяцев). Некоторое количество исследований показывает, что прогноз является
 45 плохим, в том случае, когда первичная опухоль установлена после обнаружения метастазов в яичниках, при этом прогноз становится еще хуже, если первичная опухоль остается необнаруженной.

В литературе оптимальная стратегия лечения опухоли Крукенберга четко не

установлена. Вопрос осуществления хирургического удаления недостаточно урегулирован. Химиотерапия или радиотерапия не оказывает значительного действия на прогноз пациентов с опухолью Крукенберга.

Под термином "лечить" имеется в виду введение субъекту соединения или композиции или комбинации соединений или композиций с целью предотвращения или устранения болезни, включая уменьшение размеров опухоли или количества опухолей у субъекта; задержку или замедление болезни у субъекта; ингибирование или замедление развития новой болезни у субъекта; уменьшение частоты и тяжести симптомов и/или рецидивов у субъекта, имеющего в настоящее время или ранее имевшего заболевание; и/или удлинению, т.е. увеличение продолжительности жизни субъекта.

В частности, термин "лечение болезни" включает излечение, уменьшение продолжительности, облегчение, предотвращение, замедление или ингибирование прогрессирования или ухудшения, или предотвращение или задержку начала болезни или ее симптомов.

Согласно изобретению термин "пациент" означает субъекта, нуждающегося в лечении, в частности, больного субъекта, включая людей, нечеловекообразных приматов или других животных, в частности, млекопитающих, таких как коровы, лошади, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, или грызунов, таких как мыши и крысы. В особенно предпочтительном варианте осуществления пациент является человеком.

Термин "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2," относится к средству или комбинации средств, обеспечение наличия которых в клетках приводит к повышению уровней РНК и/или белка CLDN18.2, предпочтительно повышению уровней белка CLDN18.2 на клеточной поверхности, по сравнению с условием, когда клетки не обеспечиваются данным средством или комбинацией средств.

Предпочтительно, клетка является раковой клеткой, в частности, раковой клеткой, экспрессирующей CLDN18.2, такой как клетки описанных здесь видов рака. Термин "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2," относится, в частности, к средству или комбинации средств, обеспечение наличия которых в клетках приводит к более высокой плотности CLDN18.2 на поверхности указанных клеток по сравнению с условием, когда клетки не обеспечиваются данным средством или комбинацией средств. "Стабилизация экспрессии CLDN18.2" включает, в частности, ситуацию, когда данное средство или комбинация средств предотвращает снижение или уменьшает снижение экспрессии CLDN18.2, например, экспрессия CLDN18.2 могла бы снижаться без обеспечения наличия средства или комбинации средств, а обеспечение наличия средства или комбинации средств предотвращает указанное снижение или уменьшает снижение CLDN18.2 экспрессии. "Увеличение экспрессии CLDN18.2" включает, в частности, ситуацию, когда данное средство или комбинация средств увеличивает экспрессию CLDN18.2, например, экспрессия CLDN18.2 могла бы снижаться, оставаться в основном постоянной или увеличиваться без обеспечения наличия средства или комбинации средств, а обеспечение наличия средства или комбинации средств увеличивает CLDN18.2 экспрессию по сравнению с условием без обеспечения наличия средства или комбинации средств, так что получаемая в результате экспрессия является более высокой по сравнению с ситуацией, при которой экспрессия CLDN18.2 могла понижаться, оставаться в основном постоянной или увеличиваться без обеспечения наличия средства или комбинации средств.

Согласно изобретению термин "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2," включает химиотерапевтические средства или комбинации химиотерапевтических средств, таких как цитостатические средства.

Химиотерапевтические средства могут оказывать воздействие на клетки одним из следующих способов: (1) могут повреждать ДНК клеток, так что они не способны более воспроизводиться, (2) ингибировать синтез новых нитей ДНК, так что становится невозможной клеточная репликация, (3) останавливать митотические процессы в клетках, так что клетки не могут делиться на две клетки.

Согласно изобретению термин "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2," предпочтительно относится к средству или комбинации средств, такому как цитостатическое соединение или комбинация цитостатических соединений, обеспечение наличия которых в клетках, в частности, раковых клетках, приводит к остановке или накоплению клеток в одной или более фазах клеточного цикла, предпочтительно в одной или более фазах клеточного цикла, отличных от G1- и G1-фаз, предпочтительно отличных от G1-фазы, предпочтительно в одной или более из G2- или S-фазы клеточного цикла, такой как G1/G2-, S/G2-, G2- или S-фаза клеточного цикла. Термин "остановка или накопление клеток в одной или более фазах клеточного цикла" означает, что процент клеток, находящихся в указанной одной или более фазах клеточного цикла, увеличивается. Для самовоспроизведения каждая клетка проходит через цикл, включающий четыре фазы. Первая фаза называется G1-фаза, в этой фазе клетка готовится к удвоению своих хромосом. Вторая фаза называется S-фаза, в этой фазе происходит синтез и удвоение ДНК. Следующая фаза - это G2-фаза, в ней происходит удвоение РНК и белка. Заключительная фаза - это М-фаза, являющаяся фазой фактического деления клетки. В этой конечной стадии удвоенные ДНК и РНК расходятся и перемещаются к разным концам клетки, и клетка действительно делится на две идентичные, функциональные клетки. Химиотерапевтические средства, являющиеся ДНК-повреждающими средствами, как правило, приводят к накоплению клеток в фазе G1 и/или G2. Химиотерапевтические средства, препятствующие клеточному росту, вмешиваясь в синтез ДНК, например, антиметаболиты, как правило, приводят к накоплению клеток в S-фазе. Примерами этих лекарственных средств являются 6-меркаптопурин и 5-фторурацил.

Согласно изобретению термин "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2", включает антрациклины, такие как эпирубицин, соединения платины, такие как оксалиплатин и цисплатин, аналоги нуклеозидов, такие как 5-фторурацил или его пролекарства, таксаны, такие как доцетаксел, и аналоги камптотецина, такие как иринотекан и топотекан, и комбинации лекарственных препаратов, такие как комбинации лекарственных средств, содержащие один или более антрациклинов, таких как эпирубицин, оксалиплатин, и 5-фторурацил, такие как комбинация лекарственных средств, содержащая оксалиплатин и 5-фторурацил, или другие описанные здесь лекарственные комбинации.

В одном предпочтительном варианте осуществления "средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2", представляет собой "средство, вызывающее иммуногенную гибель клеток".

При особых обстоятельствах раковые клетки могут вступать на путь летального стресса, связанного с выделением определенной с пространственно-временной точки зрения комбинации сигналов, которая преобразуется иммунной системой в активацию опухоль-специфических иммунных ответов (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798-804).

При таком развитии событий раковые клетки начинают выделять сигналы, которые воспринимаются врожденными иммунными эффекторами, такими как дендритные клетки, чтобы инициировать когнатный (cognate) иммунный ответ, затрагивающий CD8+ Т-клетки и IFN- γ сигнальный путь, так что гибель опухолевой клетки может

вызвать эффективный противоопухолевый иммунный ответ. Эти сигналы включают пред-апоптотическую экспозицию белка-шаперона эндоплазматического ретикулума (ER) калретикулина (CRT) на клеточной поверхности, пред-апоптотическую секрецию АТФ и пост-апоптотическое высвобождение ядерного белка HMGB1. В совокупности эти процессы составляют молекулярные детерминанты иммуногенной гибели клеток (ICD). Антрациклины, оксалиплатин и γ -облучение способны индуцировать все сигналы, определяющие ICD, в то время как одного цисплатина, например, недостаточно для индукции перемещения CRT от ER к поверхности погибающих клеток - процесс, предусматривающий стресс ER, - и требуется добавление тапсигаргина, индуктора ER стресса.

Согласно изобретению термин "средство, вызывающее иммуногенную гибель клеток", относится к средству или комбинации средств, наличие которых в клетках, в частности раковых клетках, позволяет стимулировать клетки к вступлению на путь летального стресса, который в конечном итоге влечет за собой опухоль-специфические иммунные ответы. В частности, "средство, вызывающее иммуногенную гибель клеток", (при обеспечении его наличия в клетках) вызывает выделение клетками определенных с пространственно-временной точки зрения комбинации сигналов, включая, в частности, пред-апоптотическую экспозицию белка-шаперона эндоплазматического ретикулума (ER) калретикулина (CRT) на клеточной поверхности, пред-апоптотическую секрецию АТФ и пост-апоптотическое высвобождение ядерного белка HMGB1.

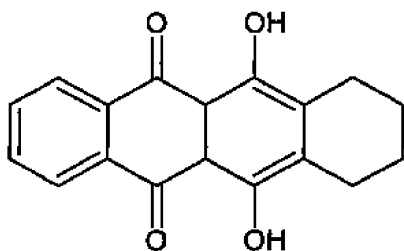
Согласно изобретению термин "средство, вызывающее иммуногенную гибель клеток", включает антрациклины и оксалиплатин.

Антрациклины - это класс лекарственных средств, обычно используемых в химиотерапии опухолей, также известный под названием антрациклиновых антибиотиков. В структурном отношении все антрациклины имеют общую структуру содержащего четыре кольца 7,8,9,10-тетрагидротетрацен-5,12-хинона и обычно нуждаются в гликозилировании в специфических сайтах.

Антрациклины предпочтительно осуществляют один или более из следующих механизмов действия: 1. Ингибирование синтеза ДНК и РНК путем интеркаляции между парами оснований ДНК/РНК цепочки, что предотвращает репликацию быстрорастущих раковых клеток. 2. Ингибирование фермента топоизомеразы II, что предотвращает релаксацию суперспиральной ДНК и таким образом блокирует транскрипцию и репликацию ДНК. 3. Образование железо-опосредованных свободных кислородных радикалов, повреждающих ДНК и мембраны клеток.

Согласно изобретению термин "антрациклин" предпочтительно имеет отношение к препарату, предпочтительно противоопухолевому препарату, предназначенному для индукции апоптоза, предпочтительно путем ингибирования повторного связывания (rebinding) ДНК с топоизомеразой.

Предпочтительно, согласно изобретению термин "антрациклин" в основном относится к классу соединений, имеющих следующую кольцевую структуру

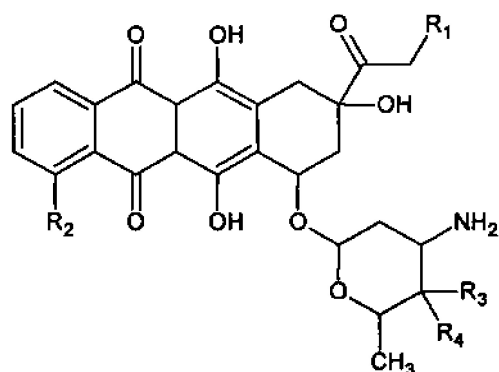


включая аналоги и производные, фармацевтические соли, гидраты, сложные эфиры,

конъюгаты и их пролекарства.

Примеры антрациклинов и аналогов антрациклинов включают, но не ограничиваются этим, даунорубин (дауномицин), доксорубин (адриамицин), эпирубин, идарубин, родомицин, пирарубин, валрубин, N-трифтор-ацетил доксорубин-14-валерат, аклациномицин, морфолинодоксорубин (морфолино-DOX), цианоморфолино-доксорубин (цианоморфолино-DOX), 2-пирролино-доксорубин (2-PDOX), 5-иминодауномицин, митоксантрон и аклациномицин А (акларубин). Митоксантрон является членом класса антрацендионов, аналогов антрациклинов, утративших сахарный компонент антрациклинов, но сохранивших плоскую полициклическую структуру ароматических колец, которая обеспечивает возможность интеркаляции в ДНК.

Особенно предпочтительным антрациклином согласно изобретению является соединение следующей формулы:

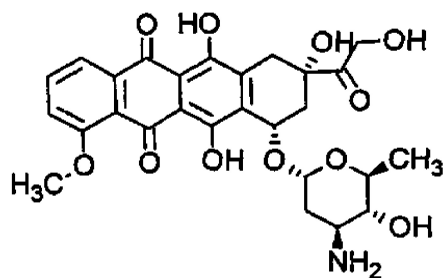


где

R₁ выбирают из группы, состоящей из Н и ОН, R₂ выбирают из группы, состоящей из Н и ОМе, R₃ выбирают из группы, состоящей из Н и ОН, и R₄ выбирают из группы, состоящей из Н и ОН.

В одном варианте осуществления R₁ представляет собой Н, R₂ представляет собой ОМе, R₃ представляет собой Н, и R₄ представляет собой ОН. В другом варианте осуществления R₁ представляет собой ОН, R₂ представляет собой ОМе, R₃ представляет собой Н, и R₄ представляет собой ОН. В другом варианте осуществления R₁ представляет собой ОН, R₂ представляет собой ОМе, R₃ представляет собой ОН, и R₄ представляет собой Н. В другом варианте осуществления R_i является Н, R₂ является Н, R₃ является Н, и R₄ представляет собой ОН.

В частности, предусмотренным в качестве антрациклина в контексте настоящего изобретения является эпирубин. Эпирубин является антрациклиновым препаратом, имеющим следующую формулу:

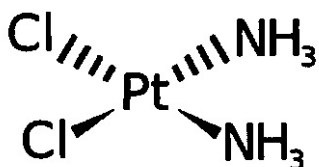


и продается под торговым названием элленс в США и под торговым названием фарморубин или эпирубин (Ebewe) в других странах. В частности, термин "эпирубин" относится к соединению (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-амино-5-гидрокси-

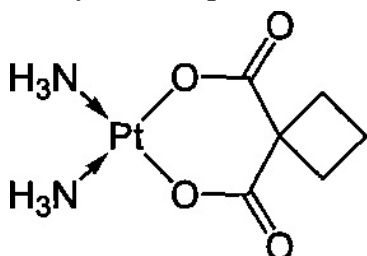
6-метил-оксан-2-ил]окси-6,11-дигидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-1-метокси-8-метил-9,10-дигидро-7H-тетрацен-5,12-диону. Эпирубицин является более предпочтительным по сравнению с доксорубицином, наиболее популярным антрациклином, в некоторых химиотерапевтических режимах, так как, по-видимому, он вызывает меньше побочных эффектов.

Согласно изобретению термин "соединение платины" имеет отношение к соединениям, содержащим платину в своих структурах, таким как платиновые комплексы, и включает такие соединения, как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

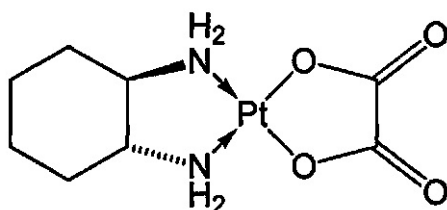
Термин "цисплатин" относится к соединению цис-диамминодихлороплатины (II) (CDDP), имеющему следующую формулу:



Термин "карбоплатин" относится к соединению цис-диаммино(1,1-циклобутандикарбоксилато)платины(II), имеющему следующую формулу:



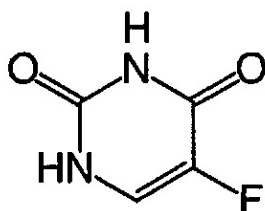
Термин "оксалиплатин" относится к соединению платины, которое образует комплекс с диаминоциклогексаном, имеющему следующую формулу:



В частности, термин "оксалиплатин" относится к соединению [(1R,2R)-циклогексан-1,2-диамин](этандиоато-О,О')платина(II). Оксалиплатин для инъекций также продается под торговым названием элоксатин.

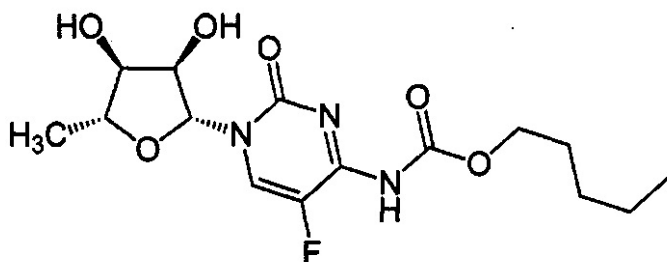
Термин "нуклеозидный аналог" относится к структурному аналогу нуклеозида, включая и аналоги пурина и аналоги пиримидина. В частности, термин "нуклеозидный аналог" относится к производным фторпиримидина, которые включают фторурацил и его пролекарства.

Термин "фторурацил" или "5-фторурацил" (5-FU или f5U) (продается под торговыми наименованиями Адруцил, Сагас, Эфудикс, Эфудекс и Флюороплекс) относится к соединению, являющемуся аналогом пиримидина и имеющему следующую формулу:



В частности, термин относится к соединению 5-фтор-1Н-пиримидин-2,4-дион.

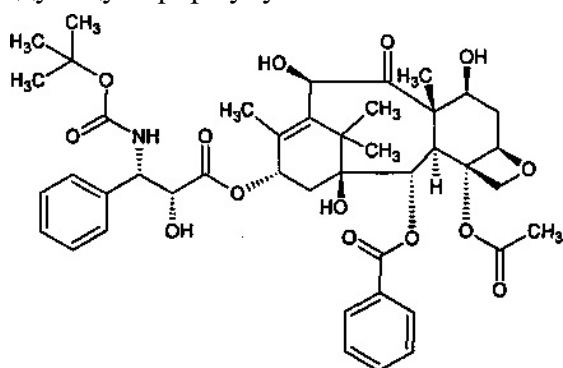
Термин "капецитабин" (Xeloda, Roche) относится к химиотерапевтическому средству, являющемуся пролекарством, которое превращается в 5-FU в тканях. Капецитабин может вводиться перорально и имеет следующую формулу:



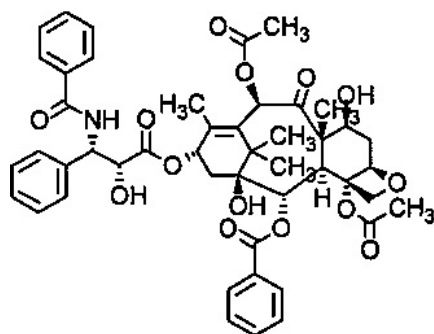
В частности, термин относится к соединению пентил [1-(3,4-дигидрокси-5-метилтетрагидрофуран-2-ил)-5-фтор-2-оксо-1Н-пиримидин-4-ил]карбамат.

Таксаны представляют собой класс дитерпеновых соединений, которые первоначально были получены из природных источников, таких как растения рода *Taxus*, а некоторые были синтезированы искусственно. Основным механизмом действия лекарственных препаратов класса таксанов является нарушение функции микротрубочек, и таким образом ингибирование процесса клеточного деления. Таксаны включают доцетаксел (таксотер) и паклитаксел (таксол).

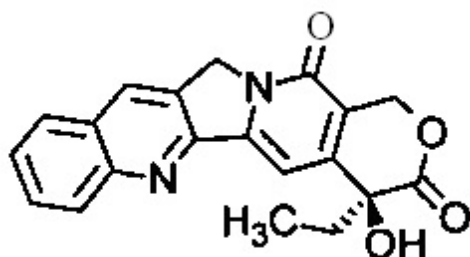
Согласно изобретению термин "доцетаксел" относится к соединению, имеющему следующую формулу:



Согласно изобретению термин "паклитаксел" относится к соединению, имеющему следующую формулу:

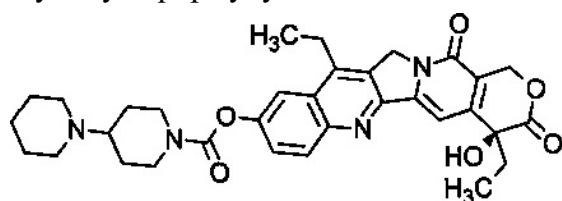


Согласно изобретению термин "аналог камптотецина" относится к производным соединения камптотецина (CPT; (S)-4-этил-4-гидрокси-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14-(4H,12H)-дион). Предпочтительно, термин "аналог камптотецина" относится к соединениям, содержащим следующую структуру:



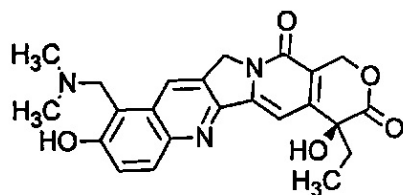
Согласно изобретению предпочтительными аналогами камптотецина являются ингибиторы фермента ДНК-топоизомеразы I (topo I). Предпочтительными аналогами камптотецина согласно изобретению являются иринотекан и топотекан.

Иринотекан является лекарственным средством, предотвращающим раскручивание ДНК путем ингибирования топоизомеразы I. С точки зрения химии, он является полусинтетическим аналогом природного алкалоида камптотецина, имеющим следующую формулу:



В частности, термин "иринотекан" относится к соединению (S)-4,11-диэтил-3,4,12,14-тетрагидро-4-гидрокси-3,14-диоксо-1H-пирано[3',4':6,7]-индолизино[1,2-b]хинолин-9-ил-[1,4'бипиридин]-1'-карбоксилат.

Топотекан является ингибитором топоизомеразы, имеющим формулу:



В частности, термин "топотекан" относится к соединению (S)-10-[(диметиламино)метил]-4-этил-4,9-дигидрокси-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14(4H,12H)-дион моногидрохлорид.

Согласно изобретению средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, может быть химиотерапевтическим средством, в частности, химиотерапевтическим средством, признанным в противоопухолевой терапии, может быть частью комбинации лекарственных средств, такой как комбинация лекарственных средств, общепринятая для применения при лечении рака. Такой комбинацией лекарственных средств может быть комбинация лекарственных средств, используемых в химиотерапии, и может быть комбинация лекарственных средств, используемых в химиотерапевтическом режиме, выбранном из группы, состоящей из EOX химиотерапии, ECF химиотерапии, ECX химиотерапии, EOF химиотерапии, FLO химиотерапии, FOLFOX химиотерапии, FOLFIRI химиотерапии, DCF химиотерапии и FLOT химиотерапии.

Комбинация лекарственных средств, используемых в режиме EOX химиотерапии, включает эпирубицин, оксалиплатин и капецитабин. Комбинация лекарственных средств, используемых в режиме ECF химиотерапии, включает эпирубицин, цисплатин и 5-фторурацил. Комбинация лекарственных средств, используемых в режиме ECX химиотерапии, включает эпирубицин, цисплатин и капецитабин. Комбинация лекарственных средств, используемых в режиме EOF химиотерапии, включает эпирубицин, оксалиплатин и 5-фторурацил.

Эпирубицин обычно назначают в дозе 50 мг/м², цисплатин в дозе 60 мг/м², оксалиплатин в дозе 130 мг/м², длительная венозная инфузия 5-фторурацила в дозе 200 мг/м²/день и перорально капецитабин 625 мг/м² два раза в день, всего восемь 3-недельных циклов.

Комбинация лекарств, используемых в режиме химиотерапии FLO, включает 5-фторурацил, фолиновую кислоту и оксалиплатин (обычно 5-фторурацил 2,600 мг/м² 24-часовая инфузия, фолиновая кислота 200 мг/м² и оксалиплатин 85 мг/м², каждые 2 недели).

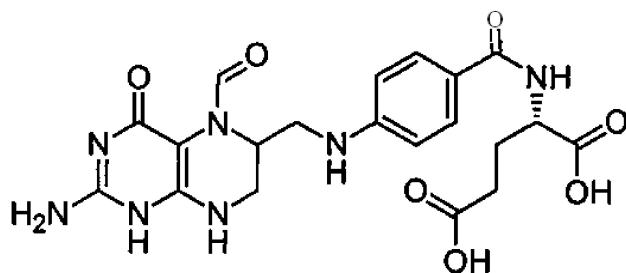
FOLFOX - это режим химиотерапии, состоящий из фолиновой кислоты (лейковорин), 5-фторурацила и оксалиплатина. Рекомендованный режим дозирования каждые две недели выглядит следующим образом: День 1: Оксалиплатин 85 мг/м² внутривенная (IV) инфузия и лейковорин 200 мг/м² IV инфузия, затем 5-FU 400 мг/м² IV введение, затем 5-FU 600 мг/м² IV введение в виде 22-часового непрерывного вливания; День 2: Лейковорин 200 мг/м² IV вливание в течение 120 минут, затем 5-FU 400 мг/м² IV введение в течение 2-4 минут, затем 5-FU 600 мг/м² IV вливание в виде 22-часового непрерывного вливания.

Комбинация лекарств, используемых в режиме химиотерапии FOLFIRI, включает 5-фторурацил, лейковорин и иринотекан.

Комбинация лекарств, используемых в режиме химиотерапии DCF, включает доцетаксел, цисплатин и 5-фторурацил.

Комбинация лекарств, используемых в режиме химиотерапии FLOT, включает доцетаксел, оксалиплатин, 5-фторурацил и фолиновую кислоту.

Термин "фолиновая кислота" или "лейковорин" относится к соединению, используемому в синергической комбинации с химиотерапевтическим препаратом 5-фторурацилом. Фолиновая кислота имеет следующую формулу:



В частности, термин относится к соединению (2S)-2-{[4-[(2-амино-5-формил-4-оксо-5,6,7,8-тетрагидро-1H-птеридин-6-ил)метиламино]бензоил]амино}пентандиовая кислота.

$\gamma\delta$ Т-клетки (гамма дельта Т-клетки) представляют небольшую подгруппу Т-клеток, которые имеют разные Т-клеточные рецепторы (TCR) на поверхности. Большинство Т-клеток имеют TCR, состоящие из двух цепей гликопротеинов, называемых α - и β -TCR цепи. В противоположность этому, у $\gamma\delta$ Т клеток TCR состоит из одной γ -цепи и одной δ -цепи. Эта группа Т-клеток еще менее распространена, чем $\alpha\beta$ Т клетки. У человека $\gamma\delta$ Т клетки играют важную роль в ответах, связанных с надзором за стрессом, подобным инфекционным болезням и аутоиммунным реакциям. Кроме того, считается, что индуцированные трансформацией изменения в опухолях вызывают ответы, связанные с надзором за стрессом, которые опосредуются $\gamma\delta$ Т-клетками, и увеличивают противоопухолевый иммунитет. Важно отметить, что после захвата антигена активированные $\gamma\delta$ Т-клетки в местах повреждений обеспечивают цитокины (например, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) и/или хемокины, опосредующие привлечение других эффекторных клеток, и демонстрируют непосредственные эффекторные функции, такие как цитотоксичность (посредством рецепторов клеточной смерти и цитолитических гранул) и ADCC.

Большая часть $\gamma\delta$ Т-клеток в периферической крови экспрессирует $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ Т-клеточный рецептор (TCR $\gamma\delta$). $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ Т-клетки характерны только для людей и приматов и, как полагают, играют заблаговременную и существенную роль в ощущении "опасности" в отношении инвазивных патогенов, поскольку их количество резко увеличивается при многих острых инфекциях и может превышать количество всех других лимфоцитов в пределах нескольких дней, например, при туберкулезе, сальмонеллезе, эрлихиозе, бруцеллезе, туляремии, листериозе, токсоплазмозе и малярии.

$\gamma\delta$ Т-клетки реагируют на небольшие непептидные фосфорилированные антигены (фосфоантигены), такие как пирофосфаты, синтезированные бактериями, и изопентенил пирофосфат (IPP), продуцированный клетками млекопитающих посредством мевалонатного пути. Тогда как выработки IPP в нормальных клетках недостаточно для активации $\gamma\delta$ Т-клеток, дисрегуляция мевалонатного пути в опухолевых клетках приводит к накоплению IPP и активации $\gamma\delta$ Т-клеток. IPPs также может быть терапевтически повышен с помощью аминокислотных фосфонатов, которые ингибируют фермент мевалонатного пути фанрезил пирофосфат синтазу (FPPS). В числе других

золендроновая кислота (ZA, золендронат, ZometaTM, Novartis) представляет собой такого рода аминокислотный фосфонат, который уже вводится пациентам в клинике для лечения остеопороза и метастатического заболевания костей. После обработки PBMCs *in vitro*, ZA поглощается исключительно моноцитами. IPP накапливается в моноцитах и они видоизменяются в антиген-презентирующие клетки, стимулирующие развитие $\gamma\delta$ Т-клеток. В данном контексте предпочтительным является добавление интерлейкина-2 (IL-2) в качестве фактора роста и выживаемости для активированных $\gamma\delta$ Т-клеток. И наконец, сообщалось, что некоторые алкилированные амины активируют $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ Т-клетки *in vitro*, однако, только в миллимолярных концентрациях.

Согласно изобретению термин "средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки", имеет отношение к соединениям, стимулирующим развитие $\gamma\delta$ Т-клеток, в частности, $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток, *in vitro* и/или *in vivo*, в частности путем индукции активации и размножения $\gamma\delta$ Т-клеток. Предпочтительно, термин имеет отношение к соединениям, увеличивающим, *in vitro* и/или *in vivo*, выработку изопентенил пирофосфата (ЕРР) в клетках млекопитающих, предпочтительно путем ингибирования фермента мевалонатного пути фарнезил пирофосфат синтазы (FPPS).

Одной отдельной группой соединений, стимулирующих $\gamma\delta$ Т-клетки, являются бисфосфонаты, в частности азотсодержащие бисфосфонаты (N-бисфосфонаты; аминобисфосфонаты).

Например, подходящие для использования в изобретении бисфосфонаты могут включать одно или более из следующих соединений, включая их аналоги и производные, фармацевтические соли, гидраты, сложные эфиры, конъюгаты и пролекарства:

[1-гидрокси-2-(1H-имидазол-1-ил)этан-1,1-диил]бис(фосфоновая кислота),

золендроновая кислота, например, золендронат;

(дихлор-фосфоно-метил) фосфоновая кислота, например, клодронат
 { 1-гидрокси-3-[метил(пентил)амино]пропан-1,1-диил } бис(фосфоновая кислота),
 ибандроновая кислота, например, ибандронат

(3-амино-1-гидроксипропан-1,1-диил)бис(фосфоновая кислота), памидроновая кислота, например, памидронат;

(1-гидрокси-1-фосфоно-2-пиридин-3-ил-этил)фосфоновая кислота, ризедроновая кислота, например, ризедронат;

(1-Гидрокси-2-имидазо[1,2-а]пиридин-3-ил-1-фосфоноэтил) фосфоновая кислота, минодроновая кислота;

[3-(диметиламино)-1-гидроксипропан-1,1-диил]бис(фосфоновая кислота), олпадроновая кислота.

[4-амино-1-гидрокси-1-(гидрокси-оксидо-фосфорил)-бутил] фосфоновая кислота, алендроновая кислота, например, алендронат;

[(Циклогептиламино)метилен]бис(фосфоновая кислота), инкадроновая кислота;

(1-гидроксиэтан-1,1-диил)бис(фосфоновая кислота), этидроновая кислота, например, этидронат; и

{ [(4-хлорфенил)тио]метилен } бис(фосфоновая кислота), тилудроновая кислота.

Согласно изобретению, золендроновая кислота (INN) или золендронат (продаваемые компанией Novartis под торговыми названиями Zometa, Zomera, Aclasta и Reclast) является особенно предпочтительным бисфосфонатом. Zometa используется для предотвращения переломов костей скелета у пациентов с такими видами рака, как множественная миелома и рак предстательной железы, а также для лечения остеопороза. Препарат также используется для лечения гиперкальциемии при злокачественных новообразованиях и может быть полезен при лечении боли, являющейся результатом костных метастазов.

В одном особенно предпочтительном варианте осуществления средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, согласно изобретению вводят в комбинации с IL-2. Показано, что такая комбинация, в частности, является эффективной при опосредовании размножения и активации $\gamma\delta2$ Т-клеток.

Интерлейкин-2 (IL-2) - это интерлейкин, тип цитокина - сигнальной молекулы в иммунной системе. Это белок, который «притягивает» лимфоциты и является частью природного иммунного ответа на микробную инфекцию, и играет роль при проведении различий между «чужой» («не свой») и «свой». IL-2 опосредует свои эффекты путем

связывания с IL-2 рецепторами, которые экспрессируются лимфоцитами.

IL-2, используемый согласно изобретению, может быть любым IL-2, содействующим или обеспечивающим возможность стимулирования $\gamma\delta$ Т-клеток, и может происходить от любых видов, предпочтительно, от человека. IL-2 может быть изолированным, полученным рекомбинантным путем или синтетическим IL-2, может быть интерлейкином природного происхождения или модифицированным IL-2.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения стандартная химиотерапия в соответствии с ЕОХ режимом в комбинации с антителом, обладающим способностью связываться с CLDN18.2, в частности IMAV362, проводится максимум в течение 8 циклов. Дозы и режимы могут быть такими, как указано далее:

- 50 мг/м² эпирубицин вводится внутривенно (i.v.) в виде 15 минутного вливания в 1 день каждого цикла в течение ЕОХ фазы.

- 130 мг/м² оксалиплатин вводится i.v. в виде 2-часового вливания в 1 день каждого цикла в течение ЕОХ фазы.

- 625 мг/м² капецитабин назначается для перорального приема (p.o.) два раза в день в течение 21 дня утром и вечером, начиная с вечера первого дня каждого цикла в течение ЕОХ фазы.

- 1000 мг/м² антител вводится i.v. в виде 2-часового вливания в 1 день цикла 1. После этого 600 мг/м² антитело вводится i.v. в виде 2-часового вливания в 1 день каждого следующего цикла после завершения вливания оксалиплатина.

- После завершения химиотерапии пациент продолжает прием 600 мг/м² антител в виде 2-часового вливания каждые 3 или 4 недели.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения стандартная химиотерапия в соответствии с ЕОХ-режимом в комбинации с ZA/IL-2 и антителом, обладающим способностью связываться с CLDN18.2, в частности IMAV362, проводится вплоть до 8 циклов (24 недели).

Термин "антиген" имеет отношение к агенту, такому как белок или пептид, содержащему эпитоп, на который направлен или должен быть направлен иммунный ответ. В предпочтительном варианте осуществления антиген является опухолеассоциированным антигеном, таким как CLDN18.2, т.е., компонентом раковых клеток, происходящим от цитоплазмы, клеточной поверхности и клеточного ядра, в частности, тех антигенов, которые вырабатываются, предпочтительно в большом количестве, внутриклеточно или как поверхностные антигены на раковых клетках.

В контексте настоящего изобретения термин "опухолеассоциированный антиген" предпочтительно имеет отношение к белкам, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в ограниченном числе тканей и/или органов или во время конкретных стадий развития и экспрессируются или ненормально экспрессируются в одной или более опухолевых или раковых тканях. В контексте настоящего изобретения опухолеассоциированный антиген предпочтительно связан с клеточной поверхностью раковой клетки и предпочтительно не экспрессируется или только крайне редко экспрессируется в нормальных тканях.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте в молекуле, т.е. части в молекуле, которая распознается иммунной системой, например, которая распознается антителом. Например, эпитопы являются отдельными, трехмерными участками на антигене, которые распознаются иммунной системой. Обычно эпитопы состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и

неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп белка, такого как CLDN18.2, предпочтительно содержит непрерывную или прерывистую часть указанного белка и составляет предпочтительно от 5 до 100, предпочтительно от 5 до 50, более предпочтительно от 8 до 30, наиболее предпочтительно от 10 до 25 аминокислот в длину, например, эпитоп может иметь предпочтительно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот в длину.

Термин "антитело" относится к гликопротеину, содержащему, по меньшей мере, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимно-соединенные дисульфидными связями, и включает любую молекулу, содержащую антигенсвязывающий участок. Термин "антитело" включает моноклональные антитела и фрагменты или производные антител, включая, без ограничения, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, например, scFv's и антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как Fab и Fab¹ фрагменты, а также включает все рекомбинантные формы антител, например, антитела, экспрессированные в прокариотах, негликозилированные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты антител и производные, как описывается здесь. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (обозначается в описании VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (обозначается в описании VL) и константной области легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности (сверхизменчивости), называемые гипервариабельными участками (CDR), чередующиеся с участками, являющимися более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепи содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканью или факторами «хозяина», включая разные клетки иммунной системы (например, эффекторных клеток) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитела, описанные в данном документе, могут быть человеческими антителами. Используемый в описании термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменную и константную области, происходящие от человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулина. Человеческие антитела, описанные в данном документе, могут содержать остатки аминокислот, некодированные человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулина (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматических мутаций *in vivo*).

Термин "гуманизированное антитело" относится к молекуле, имеющей участок связывания антигена, полученный в основном от иммуноглобулина вида животного, не являющегося человеком, при этом остальная часть молекулы иммуноглобулина основывается на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Участок связывания антигена может содержать или полные переменные домены, присоединенные к константным доменам, или только гипервариабельные участки (CDR), присоединенные к подходящим каркасным участкам в переменных доменах. Участки связывания антигена могут быть дикого типа или модифицированными с помощью одной или более аминокислотных замен, например, модифицированными для того, чтобы быть более похожими на человеческий иммуноглобулин. Некоторые

формы гуманизированных антител сохраняют все CDR-последовательности (например, гуманизированное мышинное антитело, содержащее все шесть CDR от мышинного антитела). Другие формы имеют один или более CDR, измененных относительно первоначального антитела.

5 Термин "химерное антитело" относится к антителам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей является гомологичной соответствующим последовательностям в антителе, полученном от конкретного вида или принадлежащего к определенному классу, тогда как остальной сегмент цепи является гомологичным соответствующим последовательностям другого вида. Обычно
10 вариабельный участок и легкой и тяжелой цепей копирует вариабельные участки антител, полученных от одного вида млекопитающих, тогда как константные части являются гомологичными последовательностям антител, полученных от другого вида. Одним очевидным преимуществом таких химерных форм является то, что вариабельный участок можно легко получить от известных в настоящее время источников, используя
15 легкодоступные В-клетки или гибридомы от организмов-хозяев, не являющихся человеком, в комбинации с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека. При этом, что вариабельная область имеет преимущество, заключающееся в легкости получения, а специфичность не подвергается влиянию источника, константная область, будучи человеческой, менее вероятно вызовет
20 иммунный ответ у человека при введении антител, чем вызвала бы константная область из источника, не являющегося человеком. Однако, данное определение не ограничивается этим отдельным примером.

Термины "антигенсвязывающий участок" антитела (или просто "участок связывания") или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела (или просто "связывающий фрагмент")
25 или сходные термины относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном. Показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченные термином "антигенсвязывающий участок" антитела, включают (i) Fab фрагменты, одновалентные
30 фрагменты, состоящие из VL, VH, CL и CH доменов; (ii) F(ab')₂ фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагменты, состоящие из VH и CH доменов; (iv) Fv фрагменты, состоящие из VL и VH доменов одноцепочечных антител, (v) dAb фрагменты (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546), состоящие из VH домена; (vi)
35 изолированные гипервариабельные участки (CDR) и (vii) комбинации двух или более изолированных CDR, которые необязательно могут соединяться синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить, используя рекомбинантные методы, с помощью синтетических линкеров, что дает им возможность представлять собой единую белковую
40 цепь, в которой VL и VH области располагаются парами, чтобы образовать одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv (scFv); смотри, например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включаются в термин "антигенсвязывающий участок" антитела. Дополнительным примером являются домен-
45 связывающие гибридные иммуноглобулины, содержащие (i) полипептидный домен связывания, который присоединяется к шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH₂ тяжелой цепи иммуноглобулина, присоединенную к шарнирной области, и (iii) константную область CH₃ тяжелой цепи иммуноглобулина,

присоединенную к константной области СН₂. Связывающий домен полипептида может быть вариабельной областью тяжелой цепи или вариабельной областью легкой цепи. Домен-связывающие иммуноглобулиновые гибридные белки дополнительно раскрываются в США 2003/0118592 и США 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с помощью обычных методов, известных специалистам в данной области техники, при этом фрагменты подвергаются скринингу в отношении пригодности, так же, как и интактные антитела.

Термин "биспецифическая молекула" включает любой агент, например, белок, пептид или белковый или пептидный комплекс, который имеет две разных специфичности связывания. Например, молекула может связываться с или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности, и (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки. Термин "мультиспецифическая молекула" или "гетероспецифическая молекула" включает любой агент, например, белок, пептид или белковый или пептидный комплекс, который имеет более чем две разных специфичности связывания. Например, молекула может связываться с или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности и (b) Fc-рецептором на поверхности эффекторной клетки и (с), по меньшей мере, с одним другим компонентом. Соответственно, изобретение включает, но не ограничивается этим, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и другие мультиспецифические молекулы, направленные к CLDN18.2, и к другим мишеням, таким как Fc-рецепторы на эффекторных клетках. Термин "биспецифические антитела" также включает диабоды (diabodies). Диабоды являются двухвалентными биспецифическими антителами, в которых VH и VL домены экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы дать возможность располагаться парами между двумя доменами на одной и той же цепи, таким образом, вынуждая домены образовывать пару с комплементарными доменами другой цепи и порождая два антигенсвязывающих участка (смотри, например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Антитело может быть конъюгировано с терапевтической молекулой или агентом, таким как цитотоксин, лекарственным средством (например, иммуносупрессорным средством) или радиоизотопом. Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, которое наносит ущерб и, в частности, уничтожает клетки. Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидиум бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, диgidроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи. Подходящие для образования конъюгатов с антителами терапевтические средства включают, но не ограничиваются этим, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнитол, стрептозотозин, митомицин C, и цис-дихлородиамина платина (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (раньше даунорубицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (раньше актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС), и антимицотические средства (например, винкристин и винбластин). В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое средство является цитотоксическим средством или радиотоксическим средством. В другом варианте осуществления терапевтическое

средство является иммуносупрессорным средством. В другом варианте осуществления терапевтическое средство является GM-CSF. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое средство представляет собой доксорубин, цисплатин, блеомицин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид или ридин А.

5 Антитела также могут быть конъюгированы с радиоизотопом, например, иодом-131, иттрием-90 или индием-111, для получения цитотоксических радиофармацевтических средств.

Конъюгаты антител изобретения можно использовать для того, чтобы модифицировать данный биологический ответ, при этом лекарственная частица (drug moiety) не должна рассматриваться как ограничивающая классические химические терапевтические лекарственные средства. Например, лекарственная частица может быть белком или полипептидом, обладающим желательной биологической активностью. Такой белок может включать, например, ферментативно активный токсин, или его активный фрагмент, такой как абрин, ридин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон-γ; или модификаторы биологического ответа такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 ("IL-1"), интерлейкин-2 ("IL-2"), интерлейкин-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор ("G-CSF") или другие факторы роста.

Методы конъюгирования такой терапевтической частицы с антителом хорошо известны, смотри, например, Arnon et al, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) и Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

При использовании в описании антитело "происходит от" отдельной зародышевой последовательности, если антитело получено из системы путем иммунизирования животного или путем скрининга библиотеки генов иммуноглобулинов, и при этом выбранное антитело является, по меньшей мере, на 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 95%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98%, или 99% аналогичным по последовательности аминокислот относительно последовательности аминокислот, кодированной зародышевым геном иммуноглобулина. Как правило, антитело, происходящее от отдельной зародышевой последовательности, будет демонстрировать не более чем 10 аминокислотных различий, более предпочтительно, не более чем 5, или даже более предпочтительно, не более, чем 4, 3, 2 или 1 аминокислотное различие от аминокислотной последовательности, кодированной зародышевым геном иммуноглобулина.

При использовании в описании термин "гетероантитела" относится к двум или более антителам, их производным или антигенсвязывающим участкам, соединенным вместе, по меньшей мере, два из которых имеют разные специфичности. Эти разные специфичности включают специфичность связывания для Fc-рецептора на эффекторной клетке и специфичность связывания для антигена или эпитопа на клетке-мишени, например, опухолевой клетке.

Описанные в данном документе антитела могут быть моноклональными антителами. Используемый в описании термин "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антител с единообразным молекулярным составом. Моноклональное антитело обладает одной специфичностью связывания и сродством к отдельному эпитопу. В
 5 одном варианте осуществления моноклональные антитела вырабатываются с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от животного, не являющегося человеком, например, мыши, соединенную с иммортализованной клеткой.

Описанные в данном документе антитела могут быть рекомбинантными антителами. Используемый в описании термин "рекомбинантное антитело" включает все антитела,
 10 которые получают, экспрессируются, создаются или выделяются с помощью рекомбинантных способов, например, (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулинов или гибридомы, полученной из них, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для того, чтобы она экспрессировала антитела,
 15 например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных антител, и (d) антитела полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые затрагивают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов с другими ДНК-последовательностями.

Описанные в данном документе антитела могут происходить от разных видов,
 20 включая, но не ограничиваясь этим, мышь, крысу, кролика, морскую свинку и человека.

Описанные в данном документе антитела включают поликлональные и моноклональные антитела и включают IgA, такие как IgA1 или IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, и IgD антитела. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой IgG1 антитело, конкретнее IgG1, каппа или IgG1, лямбда изотип
 25 (т.е. IgG1, κ , λ), IgG2a антитело (например, IgG2a, κ , λ), IgG2b антитело (например, IgG2b, κ , λ), IgG3 антитело (например, IgG3, κ , λ) или IgG4 антитело (например, IgG4, κ , λ).

Термин "трансфектома" при использовании в описании включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки СНО, клетки NS/0, клетки НЕК293, клетки НЕК293Т, растительные клетки или клетки грибов,
 30 включая клетки дрожжей.

При использовании в описании "гетерологичное антитело" определяется с точки зрения трансгенного организма, продуцирующего такое антитело. Этот термин относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодированному нуклеиновокислотной последовательностью, соответствующей
 35 последовательности, обнаруженной в организме, не содержащем трансгенный организм, и как правило, полученному от вида иного, чем трансгенный организм.

При использовании в описании "гетерогрибридное антитело" относится к антителу, имеющему легкую и тяжелую цепи от разных организмов. Например, антитело, имеющее человеческую тяжелую цепь, соединенную с мышьиной легкой цепью, является
 40 гетерогрибридным антителом.

Изобретение включает все антитела и производные антител, описанные здесь, которые для целей изобретения охватываются термином "антитело". Термин "производные антител" относится к любой модифицированной форме антитела, например, конъюгату антитела и другого агента или антитела или фрагмента антитела.

Описанные здесь антитела предпочтительно являются изолированными. "Изолированное антитело" при использовании в описании относится к антителу, которое в основном свободно от других антител, имеющих другие антигенные специфичности (например, изолированное антитело, которое специфично связывается с CLDN18.2,

является в основном свободным от антител, специфично связывающих антигены, отличные от CLDN18.2). Однако, изолированное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого CLDN18.2, может иметь перекрестную реактивность к другим родственным антигенам, например, от других видов (например, видовыми гомологами CLDN18.2). Более того, изолированное антитело может быть в основном свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном варианте осуществления изобретения комбинация "изолированных" моноклональных антител имеет отношение к антителам, имеющим разные специфичности и объединенным в четко определенную композицию или смесь.

Термин "связывание" согласно изобретению предпочтительно имеет отношение к специфическому связыванию.

Согласно настоящему изобретению антитело является способным связываться с predetermined мишенью, если оно имеет значительное сродство с указанной predetermined мишенью и связывается с указанной predetermined мишенью в стандартных методах исследования. "Сродство" или "сродство связывания" часто оценивается равновесной константой диссоциации (K_D). Предпочтительно термин "значительное сродство" относится к связыванию с predetermined мишенью с константой диссоциации (K_D) 10^{-5} М или ниже, 10^{-6} М или ниже, 10^{-7} М или ниже, 10^{-8}

М или ниже, 10^{-9} М или ниже, 10^{-10} М или ниже, 10^{-11} М или ниже или 10^{-12} М или ниже.

Антитело не является способным (значительно) связываться с мишенью, если оно не обладает значительным сродством к указанной мишени и не связывается значительно, в частности, не связывается поддающимся обнаружению образом, с указанной мишенью в стандартных методах анализа. Предпочтительно антитело необнаружимо связывается с указанной мишенью, если присутствует в концентрации до 2, предпочтительно 10, более предпочтительно 20, в частности 50 или 100 мкг/мл или выше. Предпочтительно антитело не имеет значительного сродства к мишени, если оно связывается с указанной мишенью с K_D , которая является, по меньшей мере, в 10-раз, 100-раз, 10^3 -раз, 10^4 -раз,

10^5 -раз или 10^6 -раз выше, чем K_D связывания с predetermined мишенью, с которой способно связываться антитело. Например, если бы K_D связывания антитела с мишенью, с которой способно связываться антитело, составляло 10^{-7} М, тогда K_D связывания с мишенью, к которой антитело не имеет значительного сродства, составляло бы, по меньшей мере, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Антитело является специфическим для predetermined мишени, если оно способно связываться с указанной predetermined мишенью, тогда как оно не способно связываться с другими мишенями, т.е. обладает незначительным сродством к другим мишеням и незначительно связывается с другими мишенями при стандартных методах анализа. Согласно изобретению антитело является специфическим к CLDN18.2, если оно способно связываться с CLDN18.2, но (практически) неспособно связываться с другими мишенями. Предпочтительно, антитело является специфическим к CLDN18.2, если сродство и связывание с другими мишенями не превышает значительно сродство к или связывание с белками, неродственными с CLDN18.2, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или трансмембранные белки, не являющиеся клаудинами, такие как молекулы MHC или рецептор трансферрина или любой другой специфический полипептид.

Предпочтительно антитело является специфическим для predetermined мишени,

если оно связывается с указанной мишенью с K_D , являющейся, по меньшей мере, в 10-раз, 100-раз, 10^3 -раз, 10^4 -раз, 10^5 -раз или 10^6 -раз ниже, чем K_D связывания с мишенью, не являющейся специфической. Например, если K_D связывания антитела с мишенью, являющейся специфической составляет 10^{-7} М, тогда K_D связывания с мишенью, не являющейся специфической, должно быть, по меньшей мере, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Связывание антитела с мишенью можно определить экспериментально, используя любой подходящий метод, смотри, например, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Jam's Immunology, W.H. Freeman и Company New York, N Y (1992), и описанные здесь методы. Сродство можно легко определить с помощью обычных методов, таких как равновесный диализ; с помощью прибора BIAcore 2000, используя общие методики, предложенные производителем; с помощью радиоиммунологического анализа с использованием меченого радиоактивным изотопом целевого антигена или другими методами, известными специалистам. Данные по сродству можно проанализировать, например, с помощью метода Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Измеренное сродство отдельного взаимодействия антитело-антиген может варьировать, если измерение проводилось при разных условиях, например, концентрации соли, pH. Таким образом, измерения сродства и других параметров связывания антигена, например, K_D , IC50, предпочтительно проводятся с помощью стандартизированных растворов антитела и антигена и стандартизированного буфера.

При использовании в описании "изотип" относится к классу антител (например, IgM или IgG 1), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

При использовании в описании "переключение изотипа" относится к явлению, посредством которого класс или изотип антитела изменяется от одного класса Ig к одному из других классов Ig.

Термин "природный" при использовании в описании применительно к объекту относится к тому обстоятельству, что объект может быть найден в природе. Например, последовательность полипептида или полинуклеотида, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника, и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является природной.

Термин "перегруппированная" при использовании в описании относится к конфигурации тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулинового локуса, в котором V сегмент располагается непосредственно рядом с D-J или J сегментом в конформации, кодирующей фактически полный VH или VL домен, соответственно.

Перегруппированный генный локус иммуноглобулина (антитела) может быть установлен путем сравнения с зародышевой ДНК; перегруппированный локус будет иметь, по меньшей мере, один рекомбинированный семичленный/девятичленный гомологичный элемент.

Термин "перегруппированная" или "зародышевая конфигурация" при использовании в описании в отношении V сегмента относится к конфигурации, в которой V сегмент является нерекомбинированным для того, чтобы быть непосредственно рядом с D или J сегментом.

Согласно изобретению антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является антителом, способным связываться с эпитопом, присутствующим на CLDN18.2, предпочтительно эпитопом, расположенным в пределах внеклеточных доменов

CLDN18.2, в частности первом внеклеточном домене, предпочтительно в положениях аминокислот от 29 до 78 CLDN18.2. В отдельных вариантах осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является антителом, способным связываться с (i) эпитопом на CLDN18.2, не присутствующим на CLDN18.1,

- 5 предпочтительно SEQ ID NO: 3, 4 и 5, (ii) эпитопом, расположенным на CLDN18.2-петля1, предпочтительно SEQ ID NO: 8, (iii) эпитопом, расположенным на CLDN18.2-петля2, предпочтительно SEQ ID NO: 10, (iv) эпитопом, расположенным на CLDN18.2-петляD3, предпочтительно SEQ ID NO: 11, (v) эпитопом, который содержит CLDN18.2-петлю1 и CLDN18.2-петлюD3, или (vi) негликозилированным эпитопом, расположенным на CLDN18.2-петляD3, предпочтительно SEQ ID NO: 9.

- Согласно изобретению антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, предпочтительно является антителом, способным связываться CLDN18.2, но не с CLDN18.1. Предпочтительно, антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является специфическим к CLDN18.2. Предпочтительно, антитело, 15 обладающее способностью связываться с CLDN18.2, предпочтительно является антителом, обладающим способностью связываться с CLDN18.2, экспрессированным на клеточной поверхности. В отдельных предпочтительных вариантах осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с нативными эпитопами CLDN18.2, присутствующими на поверхности живых клеток.
- 20 Предпочтительно, антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с одним или более пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID №: 1, 3-11, 44, 46, и 48-50. Предпочтительно, антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является специфическим для упомянутых выше белков, пептидов или иммуногенных фрагментов или их производных. Антитело, обладающее 25 способностью связываться с CLDN18.2, может быть получено способом, включающим стадию иммунизации животного белком или пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID №: 1, 3-11, 44, 46, и 48-50, или нуклеиновую кислоту или клетку-хозяина, экспрессирующую указанный белок или пептид. Предпочтительно, антитело связывается с раковыми клетками, в 30 частности клетками упомянутых выше типов рака и, предпочтительно, практически не связывается с нераковыми клетками.

- Предпочтительно, связывание антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, вызывает или опосредует уничтожение клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Клетки, экспрессирующие CLDN18.2, 35 предпочтительно являются раковыми клетками, и, в частности, их выбирают из группы, состоящей из злокачественных клеток рака желудка, пищевода, поджелудочной железы, легкого, яичника, толстой кишки, печени, головы и шеи и желчного пузыря.
- Предпочтительно, антитело вызывает или опосредует уничтожение клеток, индуцируя один или более из числа опосредованного комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) лизиса, опосредованного антителозависимой клеточноопосредованной 40 цитотоксичностью (ADCC) лизиса, апоптоза и ингибирования пролиферации клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Предпочтительно, ADCC-опосредованный лизис происходит в присутствии эффекторных клеток, которые в отдельных вариантах осуществления выбирают из группы, состоящей из моноцитов, мононуклеарных клеток, НК-клеток и PMNs. Ингибирование пролиферации клеток можно измерить *in vitro* путем 45 определения пролиферации клеток методом анализа с применением бромдезоксисуридина (5-бром-2-дезоксисуридин, BrdU). BrdU является синтетическим нуклеозидом, аналогом тимидина, и может встраиваться во вновь синтезированную ДНК воспроизводящихся

путем клеточного деления клеток (в ходе S фазы клеточного цикла), заменяя тимидин во время репликации ДНК. Обнаружение «включенного» химического вещества с помощью, например, антител, специфических к BrdU, указывает на клетки, которые активно воспроизводили свою ДНК.

5 В предпочтительных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела могут быть охарактеризованы одним или более из следующих свойств:

- а) специфичность к CLDN18.2;
- б) аффинность связывания с CLDN18.2 около 100 нМ или менее, предпочтительно, около 5-10 нМ или менее и более предпочтительно около 1-3 нМ или менее,
- 10 в) способность вызывать или опосредовать CDC CLDN18.2-положительных клеток;
- д) способность вызывать или опосредовать ADCC CLDN18.2-положительных клеток;
- е) способность ингибировать рост CLDN18.2-положительных клеток;
- ф) способность вызывать апоптоз CLDN18.2-положительных клеток.

15 В отдельном предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, вырабатывается гибридомой, депонированной в DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; new address: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany) и имеющей следующее обозначение и учетный номер:

- а. 182-D1106-055, учетный номер DSM ACC2737, депонированная 19 октября 2005
- б. 182-D1106-056, учетный номер DSM ACC2738, депонированная 19 октября 2005
- 20 в. 182-D1106-057, учетный номер DSM ACC2739, депонированная 19 октября 2005
- д. 182-D1106-058, учетный номер DSM ACC2740, депонированная 19 октября 2005
- е. 182-D1106-059, учетный номер DSM ACC2741, депонированная 19 октября 2005
- ф. 182-D1106-062, учетный номер DSM ACC2742, депонированная 19 октября 2005
- г. 182-D1106-067, учетный номер DSM ACC2743, депонированная 19 октября 2005
- 25 х. 182-D758-035, учетный номер DSM ACC2745, депонированная 17 ноября 2005
- и. 182-D758-036, учетный номер DSM ACC2746, депонированная 17 ноября 2005
- ж. 182-D758-040, учетный номер DSM ACC2747, депонированная 17 ноября 2005
- з. 182-D1106-061, учетный номер DSM ACC2748, депонированная 17 ноября 2005
- и. 182-D1106-279, учетный номер DSM ACC2808, депонированная 26 октября 2006
- 30 м. 182-D1106-294, учетный номер DSM ACC2809, депонированная 26 октября 2006
- н. 182-D1106-362, учетный номер DSM ACC2810, депонированная 26 октября 2006.

Предпочтительными антителами согласно изобретению являются антитела вырабатываемые или получаемые с помощью вышеупомянутых гибридом; т.е. 37G11 в случае 182-D1106-055, 37H8 в случае 182-D1106-056, 38G5 в случае 182-D1106-057, 35 38H3 в случае 182-D1106-058, 39F11 в случае 182-D1106-059, 43A11 в случае 182-D1106-062, 61C2 в случае 182-D1106-067, 26B5 в случае 182-D758-035, 26D12 в случае 182-D758-036, 28D10 в случае 182-D758-040, 42E12 в случае 182-D1106-061, 125E1 в случае 182-D1106-279, 163E12 в случае 182-D1106-294, и 175D10 в случае 182-D1106-362; и их химерные и гуманизированные формы.

40 Предпочтительные химерные антитела и их последовательности показаны в следующей таблице.

	клон	mAb	изотип	вариабельная область	химерное антитело
Тяжелая цепь	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
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:19
Легкая цепь	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: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

В предпочтительных вариантах осуществления антитела, в частности, химерные формы антител согласно изобретению, включают антитела, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), включающую аминокислотную последовательность, происходящую из человеческой константной области тяжелой цепи, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 13, или ее фрагмент. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления, антитела, в частности, химерные формы антител согласно изобретению, включают антитела, содержащие константную область легкой цепи (CL), включающую аминокислотную последовательность, происходящую из человеческой константной области легкой цепи, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 12, или ее фрагмент. В отдельном предпочтительном варианте осуществления антитела, в частности, химерные формы антител согласно изобретению, включают антитела, которые содержат CH, включающую аминокислотную последовательность, происходящую от человеческой CH, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 13, или ее фрагмент, и которые содержат CL, включающую аминокислотную последовательность, происходящую от человеческой CL, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO:12, или ее фрагмент.

В одном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является химерным мышь/человек IgG1 моноклональным антителом, содержащим мышиную каппа вариабельную область легкой цепи, человеческую каппа константную область легкой цепи аллотип Km(3), мышиную вариабельную область тяжелой цепи, константную область человеческого IgG1, аллотип G1m(3).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления химерные формы антител включают антитела, содержащие тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, и ее фрагмента, и/или содержащие легкую цепь, включающую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, и ее фрагмента.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления химерные формы антител включают антитела, содержащие комбинацию тяжелых цепей и легких цепей, выбранных из следующих возможных вариантов (i)-(ix):

(i) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 21, или ее фрагмент,

(ii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, или ее фрагмент,

(iii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22, или ее фрагмент,

(iv) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 25 или ее фрагмент,

(v) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 24, или ее фрагмент,

(vi) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 23, или ее фрагмент,

(vii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 26, или ее фрагмент,

(viii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 27, или ее фрагмент, и

(ix) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19, или ее фрагмент, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28, или ее фрагмент,

"Фрагмент" или "фрагмент аминокислотной последовательности" при использовании в описании имеет отношение к части последовательности антитела, т.е.

последовательности, которая представляет собой последовательность антитела, укороченную на N- и/или C-концах, и которая, в том случае, когда она заменяет указанную последовательность антитела в антителе, сохраняет способность связывания указанного антитела с CLDN18.2 и предпочтительно функции указанного антитела, описанные здесь, например, CDC-опосредованный лизис или ADCC-опосредованный лизис. Предпочтительно, фрагмент аминокислотной последовательности содержит, по меньшей мере, 80%, предпочтительно, по меньшей мере, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотных остатков от указанной аминокислотной последовательности.

Фрагмент аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28, предпочтительно имеет отношение к указанной последовательности, в которой 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 аминокислоты удалены на N-конце.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит тяжелую цепь варибельной области (VH),

включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34 и их фрагмента.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит легкую цепь вариабельной области (VH),
5 включающую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 и их фрагмента.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит комбинацию тяжелой цепи вариабельной области (VH) и легкой цепи вариабельной области (VL), выбранную из
10 следующих возможных вариантов (i)-(ix):

(i) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 29, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 36, или ее фрагмент,

(ii) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 30, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 35, или ее фрагмент,
15

(ni) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 37, или ее фрагмент,

(iv) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 33, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 40, или ее фрагмент,
20

(v) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 32, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39, или ее фрагмент,
25

(vi) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38, или ее фрагмент,

(vii) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 41, или ее фрагмент,
30

(viii) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 42, или ее фрагмент,

(ix) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 43, или ее фрагмент.
35

В предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит VH, включающую набор гипервариабельных участков CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих вариантов осуществления (i) - (vi):
40

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

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

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

(iv) CDR1: положения 45-52 SEQ ID NO: 17, CDR2: положения 70-77 SEQ ID NO: 17, GDR3: положения 116-126 SEQ ID NO: 17,

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

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

5 В предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит VL, включающую набор гипервариабельных участков CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих вариантов осуществления (i)-(ix):

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

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

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

(iv) CDR1: положения 47-58 SEQ ID NO: 23, CDR2: положения 76-78 SEQ ID NO: 23, 15 CDR3: положения 115-123 SEQ ID NO: 23,

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

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

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

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

(ix) CDR1: положения 47-52 SEQ ID NO: 28, CDR2: положения 70-72 SEQ ID NO: 28, 25 CDR3: положения 109-117 SEQ ID NO: 28.

В предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, содержит комбинацию VH и VL, каждая из которых включает набор гипервариабельных участков CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих вариантов осуществления (i)-(ix):

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

(ii) VH: CDR1: положения 45-52 SEQ ID NO: 15, CDR2: положения 70-77 SEQ ID NO: 15, CDR3: положения 116-126 SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: положения 47-58 SEQ ID NO: 35 20, CDR2: положения 76-78 SEQ ID NO: 20, CDR3: положения 115-123 SEQ ID NO: 20,

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

(iv) VH: CDR1: положения 44-51 SEQ ID NO: 18, CDR2: положения 69-76 SEQ ID NO: 40 18, CDR3: положения 115-125 SEQ ID NO: 18, VL: CDR1: положения 47-58 SEQ ID NO: 25, CDR2: положения 76-78 SEQ ID NO: 25, CDR3: положения 115-122 SEQ ID NO: 25,

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

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

(vii) VH: CDR1: положения 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положения 71-78 SEQ ID NO:

19, CDR3: положения 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положения 47-58 SEQ ID NO: 26, CDR2: положения 76-78 SEQ ID NO: 26, CDR3: положения 115-123 SEQ ID NO: 26, (viii) VH: CDR1: положения 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положения 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положения 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положения 47-58 SEQ ID NO: 27, CDR2: положения 76-78 SEQ ID NO: 27, CDR3: положения 115-123 SEQ ID NO: 27, и (ix) VH: CDR1: положения 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положения 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положения 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положения 47-52 SEQ ID NO: 28, CDR2: положения 70-72 SEQ ID NO: 28, CDR3: положения 109-117 SEQ ID NO: 28.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, предпочтительно содержит один или более гипервариабельных участков (CDRs), предпочтительно, по меньшей мере, CDR3 вариабельный участок, вариабельной области тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной области легкой цепи (VL) моноклонального антитела к CLDN18.2, предпочтительно моноклонального антитела к CLDN18.2, описанного в данном документе, и предпочтительно содержит один или более гипервариабельных участков (CDRs), предпочтительно, по меньшей мере, CDR3 вариабельный участок, вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и/или вариабельных областей легкой цепи (VL), описанных здесь. В одном варианте осуществления указанный один или более гипервариабельных участков (CDRs) выбирают из набора гипервариабельных участков CDR1, CDR2 и CDR3, описанных здесь. В особенно предпочтительном варианте осуществления антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, предпочтительно содержит гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной области тяжелой цепи (VL) моноклонального антитела к CLDN18.2, предпочтительно моноклонального антитела к CLDN18.2, описанному здесь, и предпочтительно содержит гипервариабельные участки CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных областей тяжелой цепи (VH) и/или вариабельных областей легкой цепи (VL), описанных здесь.

В одном варианте осуществления антитело, содержащее один или более CDRs, набор CDRs или комбинацию наборов CDRs, как описано здесь, включает указанные CDRs вместе с их промежуточными каркасными участками. Предпочтительно, данный участок будет также включать, по меньшей мере, около 50% любого или обоих из первого и четвертого каркасных участков, причем, будучи на 50% С-концевыми 50% первого каркасного участка и N-концевыми 50% четвертого каркасного участка. Создание антител методами рекомбинантных ДНК может приводить к введению N- или С-концевых остатков в вариабельные участки, кодированные линкерами, введенными для облегчения клонирования или других стадий манипуляции, включая введение линкеров для соединения вариабельных областей изобретения с дополнительными белковыми последовательностями, включая тяжелые цепи иммуноглобулинов, другие вариабельные домены (например, при получении диабоды) или белковые метки.

В одном варианте осуществления антитело, содержащее один или более CDRs, набор CDRs или комбинацию наборов CDRs, как описано здесь, содержит указанные CDRs в каркасном участке антитела человека.

Ссылка в данном документе на антитело, содержащее в его тяжелой цепи конкретную цепь или конкретную область (участок) или последовательность, предпочтительно относится к ситуации, в которой все тяжелые цепи указанного антитела содержат указанную конкретную цепь, область или последовательность. Это соответственно применимо к легкой цепи антитела.

Использованный в описании термин "нуклеиновая кислота" включает ДНК и РНК.

Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК.

Согласно изобретению термин "экспрессия" используется в его наиболее общем значении и включает выработку РНК или РНК и белка/пептида. Термин также включает

5 частичную экспрессию нуклеиновых кислот. Кроме того, экспрессия может протекать временно или постоянно.

Следует учитывать, что изложенная в документе идея в отношении специфических аминокислотных последовательностей, например, указанных в списке

10 последовательностей, также имеет отношение к вариантам указанных специфических последовательностей, приводящим к образованию последовательностей, которые являются функционально эквивалентными указанным специфическим последовательностям, например, аминокислотным последовательностям, демонстрирующим свойства, идентичные или подобные, свойствам специфических аминокислотных последовательностей. Одним важным свойством является сохранение

15 связывания антитела с его мишенью или подтверждение эффекторных функций антитела. Предпочтительно, последовательность, которая является вариантом относительно специфической последовательности, в том случае, когда она заменяет специфическую последовательность в антителе, сохраняет способность связывания указанного антитела с CLDN18.2 и предпочтительно функции указанного антитела, как описано здесь,

20 например, CDC-опосредованный лизис или ADCC-опосредованный лизис.

Специалистам в данной области ясно, что последовательности CDR, гипервариабельных и вариабельных областей могут быть модифицированы без потери способности связываться с CLDN18.2. Например, CDR участки будут являться или идентичными или высоко гомологичными участкам антитела, определенного в описании.

25 Под "высокогомологичным" имеется в виду, что может быть сделано от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, например от 1 до 3 замен, или 1 или 2 замены в CDRs. Кроме того, гипервариабельные и вариабельные области могут быть модифицированы так, чтобы они показывали значительную гомологию с областями антитела, в частности, раскрытого в описании.

30 Для целей настоящего изобретения "варианты" аминокислотной последовательности включают варианты с вставками аминокислот, варианты с добавками аминокислот, варианты с делециями аминокислот и/или варианты с заменами аминокислот. Варианты с делециями аминокислот, содержащие делению на N-конце и/или C-конце белка, также называются N-концевыми и/или C-концевыми укороченными вариантами.

35 Варианты со вставкой аминокислот включают вставки одной или двух или более аминокислот в отдельную аминокислотную последовательность. В случае имеющих вставку вариантов аминокислотной последовательности в отдельный участок аминокислотной последовательности вставляется один или более аминокислотных остатков, хотя при соответствующем скрининге полученного продукта также можно

40 обнаружить случайные вставки.

Варианты аминокислотных добавок включают амино- и/или карбокси-концевые слияния с одной или более аминокислотами, например, с 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислотами.

Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или более

45 аминокислот из последовательности, например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или более аминокислот. Делеции могут происходить в любом месте белка.

Варианты с заменами аминокислот характеризуются, по меньшей мере, удалением одного остатка в последовательности и вставкой другого остатка на его место.

Предпочтение отдается модификациям, находящимся в положениях аминокислотной последовательности, которые не являются консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или заменам аминокислот на другие аминокислоты, имеющие сходные свойства. Предпочтительно аминокислотные изменения в белковых вариантах являются консервативными аминокислотными изменениями, т.е. заменами аналогично заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативное изменение аминокислоты имеет отношение к замене одной из семейства аминокислот, которые являются родственными по структуре боковой цепи. Природные аминокислоты подразделяются на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенил ал анин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серии, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируются вместе как ароматические аминокислоты.

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая является вариантом указанной данной аминокислотной последовательностью, будет составлять, по меньшей мере, около 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%.

Степень сходства или идентичность предпочтительно предоставляется для аминокислотной области, которая составляет, по меньшей мере, около 10%, по меньшей мере, около 20%, по меньшей мере, около 30%, по меньшей мере, около 40%, по меньшей мере, около 50%, по меньшей мере, около 60%, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере, около 80%, по меньшей мере, около 90% или около 100% полной длины эталонной аминокислотной последовательности. Например, если эталонная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, степень сходства или идентичность предпочтительно предоставляется, по меньшей мере, примерно для 20, по меньшей мере, примерно 40, по меньшей мере, примерно 60, по меньшей мере, примерно 80, по меньшей мере, примерно 100, по меньшей мере, примерно 120, по меньшей мере, примерно 140, по меньшей мере, примерно 160, по меньшей мере, примерно 180 или примерно для 200 аминокислот, предпочтительно последовательных аминокислот. В предпочтительных вариантах осуществления предоставляется степень сходства или идентичность с полной длиной эталонной аминокислотной последовательности.

Выравнивание для определения степени сходства последовательности, предпочтительно идентичности последовательности, можно выполнить известными в данной области техники способами, предпочтительно с использованием самого лучшего способа выравнивания последовательности, например, Align с использованием стандартных настроек, предпочтительно EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Сходство последовательности" указывает процент аминокислот, которые или являются идентичными или которые представляют собой консервативные аминокислотные замены. "Идентичность последовательности" между двумя аминокислотными последовательностями указывает процент аминокислот, которые являются идентичными между данными последовательностями.

Термин "процент идентичности" предназначен для обозначения процента аминокислотных остатков, идентичных между двумя сравниваемыми последовательностями после выполнения наиболее оптимального выравнивания, этот процент является чисто статистическим, а различия между двумя последовательностями распределяются случайно и в пределах их полной длины. Сравнение

последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями обычно осуществляется путем сравнения этих последовательностей после их оптимального выравнивания, указанное сравнение проводится посредством сегмента или "окна сравнения" для того, чтобы установить и сравнить локальные области сходства последовательности. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, кроме способа «вручную», посредством алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, посредством алгоритма локальной гомологии Needleman и Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, посредством метода поиска сходства Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, или посредством компьютерных программ с применением этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Процент идентичности вычисляется путем определения числа идентичных положений между двумя последовательностями при сравнении, делением этого числа на число сравниваемых положений и умножением полученного результата на 100 для того, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями.

Термин "трансгенное животное" относится к животному, имеющему геном, содержащий один или более трансгенов, предпочтительно трансгенов тяжелой и/или легкой цепи, или трансхромосом (или интегрированных или неинтегрированных в природную геномную ДНК животного), предпочтительно способных экспрессировать трансгены. Например, трансгенная мышь может иметь трансген человеческой легкой цепи и или трансген человеческой тяжелой цепи или трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так что мышь продуцирует человеческие анти-CLDN18.2 антитела, когда она иммунизирована CLDN18.2-антигеном и/или клетками, экспрессирующими CLDN18.2. Трансген человеческой тяжелой цепи может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенной мыши, например, NuMAb мыши, например HCo7 или HCo12 мыши, или трансген человеческой тяжелой цепи может быть сохранен экстрахромосомно, как в случае трансхромосомных (например, KM) мышей, как описано в WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши могут быть способны продуцировать множество изотипов человеческих моноклональных антител к CLDN18.2 (например, IgG, IgA и/или IgE) при проведении V-D-J рекомбинации и переключения изотипа.

"Уменьшать", "снижать" или "ингибировать" при использовании в описании означает способность вызывать общее уменьшение, предпочтительно на 5% или больше, 10% или больше, 20% или больше, более предпочтительно 50% или больше и наиболее предпочтительно на 75% или больше уровня, например, уровня экспрессии или уровня пролиферации клеток.

Такие термины как "увеличение" или "усиление" предпочтительно относятся к увеличению или усилению, по меньшей мере, примерно на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, на 20%, предпочтительно, по меньшей мере, на 30%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 40%, более предпочтительно, по меньшей мере, на 50%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, на 80%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, на 100%, по меньшей мере, на 200%, по меньшей мере, на 500%, по меньшей мере, на 1000%, по меньшей мере, на 10000% или даже более.

Механизмы действия mAb

Несмотря на то, что следующее описание предоставляет обсуждение, касающееся механизма, лежащего в основе терапевтической эффективности антител изобретения, оно не должно рассматриваться как ограничивающее изобретение каким бы то ни было

образом.

Описанные здесь антитела предпочтительно взаимодействуют с компонентами иммунной системы, предпочтительно через ADCC или CDC. Описанные здесь антитела также могут использоваться для «целевой нагрузки» (например, радиоизотопами, лекарственными средствами или токсинами), для того, чтобы непосредственно убивать опухолевые клетки, или могут использоваться синергически вместе с традиционными химиотерапевтическими средствами, воздействуя на опухоли с помощью дополнительных механизмов действия, включая противоопухолевые иммунные ответы, которые могут быть нарушены из-за побочных цитотоксических эффектов химиотерапевтических препаратов на Т-лимфоциты. Однако, описанные здесь антитела также могут оказывать действие просто путем связывания с CLDN18.2 на клеточной поверхности, таким образом, например, блокируя пролиферацию клеток.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность

ADCC описывает способность эффекторных клеток, как описано здесь, в частности, лимфоцитов, убивать клетки, при этом необходимо, чтобы клетка-мишень была помечена предпочтительно антителом.

Предпочтительно ADCC наблюдается, когда антитела связываются с антигенами на опухолевых клетках, а Fc-домены антител связывают Fc-рецепторы (FcR) на поверхности иммунных эффекторных клеток. Было установлено несколько семейств Fc-рецепторов, при этом характерно, что специфические популяции клеток экспрессируют определенные Fc-рецепторы. ADCC можно рассматривать как механизм прямого разрушения (различной степени) опухоли, который приводит к презентации антигена и индукции Т-клеточных ответов, направленных на опухоль. Предпочтительно индукция ADCC *in vivo* будет приводить к Т-клеточному ответу, направленному на опухолевые клетки, и ответу антител хозяина.

Комплементзависимая цитотоксичность.

Другим способом уничтожения клеток, который может опосредоваться антителами, является CDC. Самым эффективным изотипом для активации комплемента является IgM. Также очень эффективными при направлении CDC через классический путь активации комплемента являются IgG1 и IgG3. Предпочтительно, образование комплексов антиген-антитело в этом каскаде приводит к «раскрытию» многочисленных мест связывания C1q в непосредственной близости на CH2 доменах участвующих молекул антител, например, молекул IgG (C1q является одним из трех субкомпонентов комплемента C1). Предпочтительно эти «раскрытые» места связывания C1q превращают взаимодействие C1q-IgG до этого с низким сродством в сродство с высокой авидностью, что запускает каскад событий, вовлекающих ряд других белков комплемента, и приводит к протеолитическому высвобождению хемотаксических/активирующих агентов эффекторных клеток C3a и C5a. Предпочтительно каскад комплемента оканчивается образованием мембрано-атакующего комплекса, который создает поры в клеточной мембране, что способствуют свободному прохождению воды и растворенных веществ в клетки и из клеток.

Описанные в этом документе антитела можно получить с помощью ряда методов, включая обычную методику получения моноклональных антител, например, методом гибридизации стандартных соматических клеток Kohler и Milstein, Nature 256: 495 (1975). Несмотря на то, что методы гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе можно использовать другие методы получения моноклональных антител, например, путем вирусной или онкогенной трансформации В-лимфоцитов, или метод фагового дисплея с использованием библиотек генов антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридомы, секретирующей моноклональные антитела, является мышьяная система. Получение гибридомы в мышья является общепринятым методом. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния хорошо известны в данной области техники. Слияющиеся клетки (например, мышьяные клетки миеломы) и процедуры слияния также хорошо известны.

Другими предпочтительными животными системами для получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела, являются крысы или кролики (например, система, описанная в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9348 (1995), смотри также Rossi et al., Am. J. Clin. 35 Pathol. 124: 295 (2005)).

В другом предпочтительном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела можно получить с помощью трансгенных или трансхромосомных мышья, несущих части человеческой иммунной системы, а не мышьяной системы. Эти трансгенные или трансхромосомные мышья включают мышья, известных как мышья HuMAb и мышья КМ, соответственно, и вместе упоминаются в описании как "трансгенные мышья". Получение человеческих антител в таких трансгенных мышьях можно осуществить, как подробно описано для CD20 в WO 2004 035607.

Другой стратегией получения моноклональных антител является прямое выделение генов, кодирующих антитела, из лимфоцитов, продуцирующих антитела, например, см. Babcock et al, 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Подробности разработки рекомбинантных антител смотри также в Welschof и Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 и Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Для получения антител мышья можно иммунизировать конъюгированными с носителем пептидами, полученными из последовательности антигена, т.е. последовательности, против которой направлены антитела, обогащенным препаратом рекомбинантно экспрессированного антигена или его фрагментов и/или клетками, экспрессирующими антиген, как описано. Альтернативно, мышья можно иммунизировать ДНК, кодирующей антиген или его фрагменты. В том случае, когда иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена не приводит к образованию антител, мышья также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими антиген, например, клеточной линией, чтобы содействовать иммунному ответу.

Иммунный ответ можно контролировать на протяжении выполнения протокола иммунизации, отбирая образцы плазмы и сыворотки из хвостовой вены или ретроорбитального кровотечения. Мышья с достаточным титром иммуноглобулина могут использоваться для слияния. Мышья можно подвергнуть стимуляции внутрибрюшинно и внутривенно клетками, экспрессирующими антиген, за 3 дня до забоя и удаления селезенки для того, чтобы увеличить скорость секретирования специфических антител гибридомами.

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, из лимфатических узлов или селезенки, полученных от иммунизированных мышья, могут быть выделены клетки и слиты с подходящей иммортализованной клеточной линией, например, линией клеток миеломы мышья. Затем полученные гибридомы можно отобрать по выработке антиген-специфических антител. Затем с помощью метода ELISA можно отобрать отдельные клоны с гибридомами, секретирующими антитела. С помощью иммунофлуоресценции и FACS-анализа с использованием клеток, экспрессирующих

антиген, можно установить антитела со специфичностью к антигену. Гибридомы, секретирующие антитела, можно вновь высеять, провести отбор и положительные по моноклональным антителам можно субклонировать с помощью серийного разведения. Затем стабильные субклоны культивируют *in vitro* в среде для культуры ткани, чтобы

получить и охарактеризовать антитела.

Антитела также можно получить в клетках-хозяевах, таких как, трансфектомы, используя, например, комбинацию методов рекомбинантных ДНК и методов трансфекции генов, хорошо известных в данной области техники (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Например, в одном варианте осуществления представляющие интерес гены(ген), например, гены антител, могут быть лигированы в вектор экспрессии, такой как эукариотическая экспрессирующая плаزمид, например, используемая системой экспрессии гена GS, раскрытой в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841, или другие системы экспрессии, хорошо известные в данной области. Очищенная плаزمид с клонированными генами антитела может быть введена в эукариотическую клетку-хозяина, такую как СНО клетки (клетки яичников китайского хомячка), NS/O клетки, НЕК293Т клетки или НЕК293 клетки или альтернативно другие эукариотические клетки, подобные клеткам растений, грибов или дрожжей. Для введения этих генов могут использоваться методы, описанные в данной области техники, такие как электропорация, липофектин, липофектамин или другие. После введения этих генов антител в клетки-хозяева, клетки, экспрессирующие антитело могут быть опознаны и отобраны. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые затем можно амплифицировать и масштабировать для выработки антител. Рекомбинантные антитела могут быть изолированы и очищены из этих культуральных супернатантов и/или клеток.

Альтернативно, клонированные гены антитела могут быть экспрессированы в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, такие как микроорганизмы, например, *E. coli*. Более того, антитела могут продуцироваться в трансгенных организмах, не являющихся человеком, и присутствовать, например, в молоке овец и кроликов или в яйцах кур, или в трансгенных растениях; смотри, например, Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; и Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Химеризация

Мышинные моноклональные антитела могут использоваться как терапевтические антитела для людей, в том случае, когда к ним прикрепляется токсин, или когда их метят радиоактивными изотопами. При повторном применении немеченые мышинные антитела являются высоко иммуногенными для человека, что приводит к уменьшению терапевтического эффекта. Основная иммуногенность опосредуется константными областями тяжелой цепи. Иммуногенность мышиных антител у человека можно уменьшить или полностью ее избежать, если соответствующие антитела сделать химерными или гуманизированными. Химерные антитела являются антителами, разные части которых происходят от разных видов животных, например, антитела имеют переменную область, полученную от мышиного антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина. Химеризация антител достигается соединением переменных областей тяжелой и легкой цепей мышиных антител с человеческой константной областью тяжелой и легкой цепи (например, как описано Kraus et al., в *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). В предпочтительном варианте осуществления химерные антитела получают соединением человеческой константной области каппа-легкой цепи с мышинной

вариабельной областью легкой цепи. В еще одном предпочтительном варианте осуществления химерные антитела получают соединением человеческой константной области лямбда-легкой цепи с мышинной вариабельной областью легкой цепи.

Предпочтительными константными областями тяжелой цепи для получения химерных антител являются IgG1, IgG3 и IgG4. Другими предпочтительными константными областями тяжелой цепи для получения химерных антител являются IgG2, IgA, IgD и IgM.

Гуманизация

Антитела взаимодействуют с целевыми антигенами преимущественно через аминокислотные остатки, расположенные в шести гипервариабельных участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR являются более разными между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку CDR-последовательности отвечают за большинство взаимодействий антитело-антиген, является возможной экспрессия рекомбинантных антител,

подражающих свойствам специфических природных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают CDR-последовательности от специфических природных антител, пересаженные на каркасные последовательности от другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525; и Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности можно получить из публичных баз данных ДНК, которые включают зародышевые последовательности генов антител. Эти зародышевые последовательности будут отличаться от зрелых последовательностей генов антител, так как они не включают полностью собранные изменчивые гены, которые формируются при V (D) J соединении во время созревания В-клетки. Зародышевые генные последовательности также будут отличаться от последовательностей высокоаффинного антитела из вторичного репертуара отдельной равномерной вариабельной областью.

Способность антитела связываться с CLDN6 можно определить с помощью стандартных методов анализа связывания (например, ELISA, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция и проточная цитометрия).

С целью очистки моноклональных антител отобранные гибридомы выращивают в двухлитровой роллерной колбе. Альтернативно антитела можно получить в биореакторе на основе диализа. При необходимости супернатанты можно профильтровать, концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с протеин-G-сефарозой или протеин-A-сефарозой. Чистоту элюированного IgG можно проконтролировать с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Буферный раствор можно поменять на PBS, а концентрацию можно определить при OD280 с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Для того чтобы определить, связываются ли отобранные моноклональные антитела с единственным эпитопом, может быть применен сайт-направленный или мульти-сайт-направленный мутагенез.

Для установления изотипа очищенных антител проводили анализ ELISA с разными коммерческими наборами (например, Zymed, Roche Diagnostics). Лунки титрационных микропланшетов покрывают анти-мышинным Ig. После блокировки (ингибирования) проводили реакцию с моноклональными антителами или очищенными изотипными контролями при комнатной температуре в течение двух часов. Затем проводили реакцию или с мышинным IgG1, IgG2a, IgG2b или IgG3, IgA или со специфическим мышинным IgM,

конъюгированным с пероксидазой. После промывки планшеты обрабатывают ABTS субстратом (1 мг/мл) и исследуют при OD 405-650. Альтернативно, можно использовать набор для изотипирования IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027), как описано производителем.

5 Для того, чтобы продемонстрировать наличие антител в сыворотке иммунизированных мышей или связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать проточную цитометрию. Линии клеток, экспрессирующие антиген в норме или после трансфекции, и отрицательные контроли, утратившие экспрессию антигена (выращенные при
10 стандартных условиях), смешивают с разными концентрациями моноклональных антител в супернатантах от гибридомы или в PBS, содержащем 1% FBS, и инкубируют при 4°C в течение 30 мин. После промывки меченые APC или Alexa647 анти-IgG антитела могут связываться с антиген-связанными моноклональными антителами при таких же условиях, как условия для окрашивания первичных антител. Образцы можно
15 проанализировать с помощью проточной цитометрии на приборе FACS, используя параметры прямого и бокового рассеяния света, чтобы пропускать отдельные живые клетки. Для того, чтобы отличить антиген-специфические моноклональные антитела от неспецифических связующих веществ в одном измерении, можно использовать метод ко-трансфекции. Клетки временно трансфицированные плазмидами, кодирующими
20 антиген, и флуоресцентным маркером, можно окрасить, как описано выше. Трансфицированные клетки можно обнаружить в другом диапазоне флуоресценции, чем антитело-окрашенные клетки. Так как большинство трансфицированных клеток экспрессирует оба трансгена, антиген-специфические моноклональные антитела связываются предпочтительно с клетками, экспрессирующими флуоресцентный маркер,
25 тогда как неспецифические антитела связываются в сравнимом соотношении с нетрансфицированными клетками. Можно применять альтернативный метод анализа с использованием флуоресцентной микроскопии в дополнение к или вместо проточной цитометрии. Клетки можно окрасить так, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии.

30 Для того чтобы продемонстрировать наличие антител в сыворотке иммунизированных мышей или связывание моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать иммунофлуоресцентную микроскопию. Например, клеточные линии, экспрессирующие антиген или спонтанно или после трансфекции, и отрицательные контроли, утратившие экспрессию антигена,
35 выращивают в предметных стеклах с лунками при стандартных условиях роста в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки фиксируют метанолом или параформальдегидом или оставляют необработанными. Затем проводят реакцию клеток с моноклональными антителами к антигену в течение
40 30 минут при 25°C. После промывки проводят реакцию клеток с мечеными Alexa555 анти-мышинными IgG вторичными антителами (Molecular Probes) при тех же самых условиях. После этого можно исследовать клетки с помощью флуоресцентной микроскопии.

Из клеток, экспрессирующих антиген, и соответствующих отрицательных контролей
45 можно приготовить клеточные экстракты, а затем провести электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). После электрофореза отделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, ингибируют и исследуют с помощью тестируемых моноклональных антител. IgG-

связывание можно определить с помощью анти-мышь IgG меченого пероксидазой и обнаружить с помощью ECL субстрата.

Антитела можно дополнительно протестировать на реакционную способность с антигеном с помощью иммуногистохимического анализа хорошо известным специалисту в данной области способом, например, с использованием крио-срезов, фиксированных параформальдегидом или ацетоном, или фиксированных параформальдегидом парафиновых срезов образцов нераковых тканей или раковых тканей, взятых у пациента во время обычных хирургических процедур, или у мышей с ксенотрансплантатом опухолей, инокулированных с помощью линий клеток, экспрессирующих антиген спонтанно или после трансфекции. Для иммуноокрашивания антитела, реагирующие с антигеном, могут быть проикубированы, а затем конъюгированы с мечеными пероксидазой хрена козыми анти-мышь или козыми анти-кролик антителами (DAKO) согласно инструкциям продавца.

Антитела антитела можно протестировать в отношении их способности опосредовать фагоцитоз и уничтожение клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Проверка активности моноклональных антител *in vitro* обеспечивает первоначальный скрининг до тестирования на моделях *in vivo*.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC): Коротко, полиморфноядерные клетки (PMN), NK-клетки, моноциты, мононуклеарные клетки или другие эффекторные клетки от здоровых доноров можно очистить центрифугированием в градиенте плотности фиколл-гипака, с последующим разрушением загрязняющих эритроцитов. Промытые эффекторные клетки суспендируют в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки или альтернативно с 5% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки и смешивают с ^{51}Cr -мечеными клетками-мишенями, экспрессирующими CLDN18.2, в различных соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням. Альтернативно, клетки-мишени можно пометить лигандом, усиливающим флуоресценцию (BATDA). Высоко флуоресцентный хелат европия с усиливающим лигандом, который высвобождается из мертвых клеток, можно определить с помощью флуориметра. В другом альтернативном способе может использоваться трансфекция клеток-мишеней с использованием люциферазы. При этом добавленный люцифер желтый может окисляться только живыми клетками. Затем можно добавить очищенные анти-CLDN18.2 IgGs в разных концентрациях. В качестве отрицательного контроля можно использовать нерелевантный человеческий IgG. Исследование проводится в течение от 4 до 20 часов при 37°C в зависимости от типа используемых эффекторных клеток. Цитолиз в образцах можно оценить путем измерения высвобождения ^{51}Cr или наличия хелата EuTDA в культуральном супернатанте. Альтернативно, можно измерить люминесценцию живых клеток, являющуюся результатом окисления люцифера желтого.

Также можно проверить различные комбинации анти-CLDN18.2 моноклональных антител, чтобы определить усиливается ли цитолиз при действии составов моноклональных антител.

Комплементзависимая цитотоксичность (CDC):

Моноклональные анти-CLDN6 антитела можно проверить на их способность опосредовать CDC с помощью ряда известных методов. Например, сыворотку для получения комплемента можно получить из крови известным специалистам способом. Для определения CDC-активности моноклональных антител можно использовать разные методы. Например, можно измерить высвобождение ^{51}Cr или можно оценить

повышенную проницаемость мембран с помощью метода исключения пропидиум иодида (PI). Коротко, целевые клетки промывают и 5×10^5 /мл инкубируют с разными концентрациями tMAb в течение 10-30 минут при комнатной температуре или при 37°C. Затем добавляют сыворотку или плазму до окончательной концентрации 20% (об./об.) и клетки инкубируют при 37°C в течение 20-30 минут. Ко всем клеткам каждого образца добавляют раствор PI в пробирку для FACS-анализа. После этого смесь немедленно анализируют с помощью проточной цитометрии, используя FACS-набор.

В альтернативном способе исследования индукцию CDC можно установить на прикрепленных клетках. В одном варианте осуществления этого метода анализа клетки высевают за 24 часа до исследования с плотностью 3×10^4 /лунку в плоскодонные титрационные микропланшеты для культур тканей. На следующий день ростовую среду удаляют и клетки инкубируют с антителами (три повтора). Контрольные клетки инкубируют в ростовой среде или ростовой среде, содержащей 0,2% сапонины для определения фонового лизиса и максимального лизиса, соответственно. После инкубации в течение 20 минут при комнатной температуре супернатант удаляют, и добавляют к клеткам 20% (об./об.) человеческой плазмы или сыворотки в DMEM (предварительно нагретой до 37°C) и инкубируют в течение следующих 20 минут при 37°C. К клеткам каждого образца добавляют раствор пропидий иодида (10 мкг/мл). Затем супернатанты заменяют PBS, содержащим 2,5 мкг/мл этидиум бромид, и измеряют испускание флуоресценции после возбуждения при 520 нм при 600 нм с помощью Тесал Satire. Процент специфического лизиса вычисляют как указано далее: % специфического лизиса = (флуоресценция образца - фоновая флуоресценция) / (флуоресценция при максимальном лизисе - фоновая флуоресценция) $\times$ 100.

Индукция апоптоза и ингибирование клеточной пролиферации моноклональными антителами:

Например, чтобы проверить способность моноклональных aNTH-CLDN18.2 антител инициировать апоптоз, их инкубируют с опухолевыми клетками, положительными по CLDN18.2, например, SNU-16, DAN-G, KATO-III или CLDN18.2-трансфицированными опухолевыми клетками при 37°C в течение 20 часов. Клетки собирают, промывают в аннексин-V связывающем буфере (BD biosciences), и инкубируют с аннексином V, соединенным с FITC или APC (BD biosciences), в течение 15 минут в темноте. Ко всем клеткам каждого образца добавляют раствор PI (10 мкг/мл в PBS) в пробирку для FACS-анализа и сразу оценивают с помощью проточной цитометрии (как описано выше). Альтернативно, общее ингибирование клеточной пролиферации моноклональными антителами можно определить с помощью коммерчески доступных наборов. С помощью набора для определения клеточной пролиферации DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) можно провести неизотопный иммуноанализ в микропланшетах, основанный на измерении включения 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) во время синтеза ДНК пролиферирующими клетками. Включенный BrdU определяют с помощью меченых европием моноклональных антител. Чтобы сделать возможным обнаружение антител, клетки фиксируют и проводят денатурацию ДНК, используя Fix (фиксирующий) раствор. Несвязанные антитела смывают и добавляют в раствор индуктор DELFIA, чтобы отделить ионы европия от меченых антител, где они образуют высоко флуоресцентные хелаты с компонентами индуктора DELFIA. Флуоресценция, измеренная в каждой лунке с помощью флуориметрии с временным разрешением, является пропорциональной синтезу ДНК в клетке.

Доклинические исследования

Моноклональные антитела, которые связываются с CLDN18.2, также могут быть

проверены на модели *in vivo* (например, на иммунодефицитных мышах с ксенотрансплантатами опухолей, инокулированных клеточными линиями, экспрессирующими CLDN18.2, например, DAN-G, SNU-16 или КАТО-III, или после трансфекции, например, HEK293) для установления их эффективности при контроле роста CLDN18.2-экспрессирующих опухолевых клеток.

Исследование антител изобретения *in vivo* можно провести после ксенотрансплантации опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2, иммунодефицитным мышам или другим животным. Чтобы определить действие антител на предотвращение образования опухолей или симптомов, связанных с опухолью, антитела можно ввести мышам, свободным от опухоли, с последующей инъекцией опухолевых клеток. Чтобы установить терапевтическую эффективность соответствующих антител в отношении уменьшения опухолевого роста или симптомов, связанных с опухолью, антитела можно ввести мышам-опухоленосителям. Применение антител можно комбинировать с применением других веществ, таких как цитостатические средства, ингибиторы факторов роста, блокаторы клеточного цикла, ингибиторы ангиогенеза или другими антителами, чтобы определить синергическую эффективность и потенциальную токсичность комбинаций. Чтобы проанализировать токсичные побочные явления, опосредованные антителами, животным можно инокулировать антитела или контрольные реагенты и тщательно изучить симптомы, возможно связанные с терапией антителами к CLDN18.2. В частности, возможные побочные явления от применения *in vivo* CLDN18.2-антител включают токсическое влияние на ткани, экспрессирующие CLDN18.2, включая желудок. Антитела, распознающие CLDN18.2 у человека и у других видов, например, мышей, являются, в частности, пригодными для предсказания возможных побочных явлений, опосредованных применением моноклональных CLDN18.2 -антител, у людей.

Картирование эпитопов, распознаваемых антителами, можно провести, как подробно описано в "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 и в "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

Соединения и средства, описанные в данном документе, могут быть введены в виде любой подходящей фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции в большинстве случаев предоставляются в стандартной лекарственной форме и могут быть получены хорошо известным способом. Например, фармацевтическая композиция может иметь форму раствора или суспензии.

Фармацевтическая композиция может содержать соли, буферные вещества, консервирующие вещества, носители, разбавители и/или эксципиенты, все из которых предпочтительно являются приемлемыми с точки зрения фармацевтики. Термин "фармацевтически приемлемый" относится к нетоксичному веществу, которое не вмешивается в действие активного компонента фармацевтической композиции.

Соли, не являющиеся фармацевтически приемлемыми, могут использоваться для получения фармацевтически приемлемых солей и включаются в изобретение. Фармацевтически приемлемые соли этого типа включают, без ограничения, соли, полученные из следующих кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, серной, азотной, фосфорной, малеиновой, уксусной, салициловой, лимонной, муравьиной, малоновой, янтарной и тому подобных. Фармацевтически приемлемые соли также могут быть получены в виде солей щелочных или щелочноземельных металлов, таких как соли натрия, соли калия и соли кальция.

Подходящие для использования в фармацевтической композиции буферные вещества

включают уксусную кислоты в виде соли, лимонную кислоту в виде соли, борную кислоту в виде соли и фосфорную кислоту в виде соли.

Подходящие для использования в фармацевтической композиции консервирующие вещества включают бензалкония хлорид, хлорбутанол, парабен и тимеросал.

5 Предназначенная для инъекций композиция может содержать фармацевтически приемлемый эксципиент, такой как лактат Рингера.

Термин "носитель" имеет отношение к органическому или неорганическому компоненту, природного или синтетического происхождения, с которым активный компонент объединяется, для того, чтобы облегчить, усилить или способствовать
10 применению. Согласно изобретению термин "носитель" также включает один или более совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей или инкапсулирующих веществ, пригодных для введения пациенту.

Приемлемыми для парентерального введения веществами-носителями являются, например, стерильная вода, раствор Рингера, лактат Рингера, стерильный раствор
15 хлорида натрия, полиалкиленгликоли, гидрогенезированные нафталины и, в частности, биологически совместимые полимеры лактида, сополимеры лактида с гликолидом или сополимеры полиоксиэтилена с полиоксипропиленом.

Использованный в описании термин "эксципиент" означает все вещества, которые могут присутствовать в фармацевтической композиции и не являются активными
20 ингредиентами, такие как, например, носители, связывающие вещества, смазывающие вещества, сгущающие вещества, поверхностно-активные вещества, консервирующие вещества, эмульгирующие вещества, буферные вещества, ароматизирующие вещества или красители.

Средства и композиции, описанные в данном документе, могут вводиться любым
25 обычным способом, например, парентеральным путем, включая инъекцию или инфузию. Предпочтительно введение осуществляется парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутрикожно или внутримышечно.

Композиции, пригодные для парентерального введения, обычно включают
30 стерильные водные или неводные препараты активного соединения, предпочтительно изотонические относительно крови реципиента. Примерами совместимых носителей и растворителей являются раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, жирные масла используются в качестве среды для раствора или суспензии.

Средства и композиции, описанные в данном документе, вводятся в эффективных
35 количествах. "Эффективное количество" относится к количеству, с помощью которого достигается желательная реакция или желательный эффект отдельно или в сочетании с дополнительными дозировками. В случае лечения конкретной болезни или конкретного состояния желательная реакция предпочтительно имеет отношение к ингибированию развития болезни. Сюда включается замедление развития болезни и, в частности,
40 прерывание или обратное развитие болезни. Желательной реакцией при лечении болезни или состояния также может быть задержка начала или предотвращение начала указанной болезни или указанного состояния.

Эффективное количество средства или композиции, описанной в данном документе, будет зависеть от состояния, которое необходимо лечить, тяжести заболевания,
45 индивидуальных характеристик пациента, включая возраст, физиологическое состояние, размер и вес, продолжительность лечения, тип сопутствующего лечения (если оно имеется), конкретный способ введения и подобные факторы. Соответственно, вводимые дозировки описанных здесь средств могут зависеть от тех или иных подобных

характеристик. В том случае, когда ответ пациента является недостаточным при использовании первоначальной дозировки, могут использоваться более высокие дозы (или эффективно более высокие дозы достигаются с помощью другого более локального способа введения).

Средства и композиции, описанные в этом документе, могут вводиться пациентам, например, *in vivo*, для лечения или предотвращения целого ряда заболеваний, таких, как описанные здесь. Предпочтительными пациентами являются люди, имеющие заболевания, которые могут быть исправлены или улучшены введением средств и композиций, описанных здесь. Сюда включаются заболевания, затрагивающие клетки, которые характеризуются измененным профилем CLDN18.2.

Например, в одном варианте осуществления описанные здесь антитела могут использоваться для лечения пациента с раковой болезнью, например, раковой болезнью, как описано здесь, отличающейся наличием раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Фармацевтические композиции и способы лечения, описанные в соответствии с изобретением, также могут использоваться для иммунизации или вакцинации с целью предотвращения описанной здесь болезни.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие рамки изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Экспрессия CLDN18.2 в линии клеток рака желудка человека стабилизируется при обработке химиотерапевтическими препаратами *in vitro*

Клетки KatoIII, линия клеток рака желудка человека, культивировали в среде RPMI 1640 (Invitrogen), содержащей 20% FCS (Perbio) и 2 mM Glutamax (Invitrogen) при 37°C и 5% CO₂ с или без цитостатических соединений. Эпирубицин (Pfizer) был проверен при концентрации 10 или 100 нг/мл, 5-FU (Neofluor от компании NeoCorp AG) был проверен при концентрации 10 или 100 нг/мл, и оксалиплатин (Hospira) был проверен при концентрации 50 или 500 нг/мл. Также использовали комбинацию всех 3 соединений (EOF; эпирубицин 10 нг/мл, оксалиплатин 500 нг/мл, 5-FU 10 нг/мл). 8×10⁵ клеток KatoIII культивировали в течение 96 часов, не меняя среду, или в течение 72 часов с последующим культивированием в течение 24 часов в стандартной среде, чтобы «высвободить» клетки из остановки клеточного цикла, в 6-луночных культуральных планшетах при 37°C, 5% CO₂. Клетки собирали, используя EDTA/трипсин, промывали и исследовали.

Для обнаружения внеклеточного CLDN18.2 клетки окрашивали моноклональными аНТН-CLDN18.2 антителами IMAB362 (Ganymed) или родственными по изотипу контрольными антителами (Ganymed). В качестве вторичного реагента использовали козы-анти-huIgG-APC от компании Dianova.

Определение стадий клеточного цикла основывалось на измерении содержания ДНК в клетках. Это давало возможность различить клетки, находящиеся в фазах G1, S или G2 клеточного цикла. В S-фазе происходит удвоение ДНК, тогда как в G2-фазе клетки растут и готовятся к митозу. Анализ клеточного цикла был сделан с использованием набора CycleTEST PLUS DNA Reagent от компании BD Biosciences в соответствии с протоколом производителя. Проточную цитометрию и ее анализ проводили с помощью программного обеспечения BD FACS CantoII (BD Biosciences) и FlowJo (Tree Star).

Столбцы на фигуре 1a и b показывают соответствующий процент клеток в G1-, S- или G2-фазе клеточного цикла. Клетки KatoIII, культивированные в среде, демонстрируют остановку клеточного цикла преимущественно в G1-фазе. Клетки,

обработанные 5-FU, преимущественно блокируются в S-фазе. Клетки KatoIII, обработанные эпирубицином или EOF, демонстрируют остановку клеточного цикла преимущественно в G2-фазе. При обработке клеток оксалиплатином наблюдается накопление клеток преимущественно в G1- и G2-фазах. Как видно на фигуре 1с, остановка клеточного цикла в S-фазе или G2-фазе приводит к стабилизации или повышению экспрессии CLDN18.2. Сразу после того, как клетки выходят из какой-либо фазы клеточного цикла (фигура 1b), экспрессия CLDN18.2 на клеточной поверхности клеток KatoIII повышается (фигура 1d).

Клетки NUGC-4 и KATO III обрабатывали 5-FU + OX (10 нг/мл 5-FU и 500 нг/мл оксалиплатина), EOF (10 нг/мл эпирубицина, 500 нг/мл оксалиплатина и 10 нг/мл 5-FU) или FLO (10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолиновой кислоты и 500 нг/мл оксалиплатина) в течение 96 часов. РНК предварительно обработанных химиотерапевтическими препаратами NUGC-4 и KATO III клеток была выделена и преобразована в кДНК. Уровень CLDN18.2 транскрипта анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Результаты показаны на фигуре 2а в виде относительной экспрессии в сравнении с уровнем транскрипта конститутивного гена HPRT. На фигуре 2b показан вестерн-блоттинг CLDN18.2 и «нагруженных» актином контрольных необработанных и обработанных клеток NUGC-4. Интенсивность сигнала люминесценции показана в процентах относительно актина.

Предварительная обработка NUGC-4 и KATO III клеток EOF, FLO, а также комбинацией 5-FU + OX химиотерапевтических препаратов приводила к увеличению уровней РНК и белка CLDN18.2, что показано с помощью количественной ПЦР в реальном времени (фигура 2а) и вестерн-блоттинга (фигура 2b).

Связывание IMAV362 на NUGC-4 и KATO III клетках рака желудка, обработанных EOF (10 нг/мл эпирубицина, 500 нг/мл оксалиплатина и 10 нг/мл 5-FU) или FLO (10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолиновой кислоты и 500 нг/мл оксалиплатина) в течение 96 часов анализировали с помощью проточной цитометрии. Наблюдалось повышение количества белка CLDN18.2, на который нацеливается IMAV362 на поверхности клеток рака желудка, как видно на фигуре 2с. Этот эффект наиболее выражен на клетках, предварительно обработанных EOF или FLO.

Клетки KatoIII предварительно обрабатывали в течение 4 дней иринотеканом или доцетакселом и анализировали экспрессию CLDN18.2 и остановку клеточного цикла. Обработка клеток иринотеканом приводила к зависящему от дозы ингибированию клеточного роста и остановке клеточного цикла в S/G2-фазе (фигура 3). Обработка клеток доцетакселом приводила к дозо-зависимому ингибированию клеточного роста и остановке клеточного цикла в G2-фазе (фигура 3).

Пример 2: Предварительная обработка клеток рака желудка человека химиотерапевтическими препаратами дает в результате более высокую эффективность IMAV362-опосредованного ADCC

IMAV362-опосредованный ADCC изучали, используя в качестве мишеней клетки рака желудка NUGC-4, которые предварительно обрабатывали 10 нг/мл 5-FU и 500 нг/мл оксалиплатина (5-FU + OX), 10 нг/мл эпирубицина, 500 нг/мл оксалиплатина и 10 нг/мл 5-FU (EOF) или 10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолиновой кислоты и 500 нг/мл оксалиплатина (FLO) в течение 96 часов (отношение эффектор: мишень 40:1) или ничем не обрабатывали. Значения EC₅₀ были получены от 7 здоровых доноров для необработанных и предварительно обработанных EOF, FLO или 5-FU + OX клеток NUGC-4.

Как показано на фигуре 4а, кривая зависимости доза-эффект в отношении

предварительно обработанных клеток сдвинута вверх и влево по сравнению с необработанными клетками-мишенями. В результате этого наблюдался более высокий максимальный лизис и уменьшение значений ЕС₅₀ до одной трети значения необработанных клеток (фигура 4b).

5 Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCS), включая NK-клетки, моноциты, мононуклеарные клетки или другие эффекторные клетки от здоровых людей-доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл-гипака. Промытые эффекторные клетки высевали в X-Vivo среду. При такой постановке задачи в качестве клеток-мишеней использовали KatoIII клетки гастрального происхождения, 10 эндогенно экспрессирующие CLDN18.2. Только живые клетки окисляют люцифер желтый с помощью фермента люциферазы, который стабильно экспрессируется клетками-мишенями. Очищенное анти-CLDN18.2 антитело IMAB362 добавляли в разных концентрациях, а в качестве изотипического контрольного антитела использовали нерелевантное химерное huIgG1 антитело. Цитолиз в образцах оценивали путем 15 измерения люминесценции, являющейся результатом окисления люцифера желтого, что является показателем количества живых клеток, оставшихся после IMAB362-индуцированной цитотоксичности. KatoIII клетки, предварительно обработанные в течение 3 дней иринотеканом (1000 нг/мл), доцетакселем (5 нг/мл) или цисплатином (2000 нг/мл), сравнивали с клетками-мишенями, культивированными в среде без 20 обработки препаратами, и оценивали IMAB362-индуцированный ADCC.

При предварительной обработке в течение 3 дней иринотеканом, доцетакселем или цисплатином клеток KatoIII наблюдался более низкий уровень живых клеток по сравнению с клетками-мишенями, культивированными в среде (фигура 5a), при этом экспрессия клаудина18.2 в клетках, предварительно обработанных иринотеканом, 25 доцетакселем или цисплатином, была повышена по сравнению с клетками, культивированными в среде (фигура 5b).

Кроме того, предварительная обработка клеток KatoIII иринотеканом, доцетакселем или цисплатином увеличивала потенциальную возможность IMAB362 вызывать ADCC (фигура 5c, d).

30 Пример 3: Химиотерапия приводит к более высокой эффективности IMAB362-индуцированного CDC

Эффекты химиотерапевтических средств на IMAB362-индуцированный CDC исследовали с помощью предварительной обработки клеток рака желудка KatoIII комбинацией 5-FU 10 нг/мл и оксалиплатина 500 нг/мл (5-FU + OX) в течение 48 часов. 35 Типичные кривые доза-эффект IMAB362-индуцированного CDC с использованием предварительно обработанных химиотерапевтическими препаратами клеток KatoIII показаны на фигуре 6. Предварительная обработка опухолевых клеток в течение 48 часов увеличивала потенциальную возможность IMAB362 вызывать CDC, что приводило к более высокому максимальному лизису предварительно обработанных опухолевых 40 клеток по сравнению с необработанными клетками.

Пример 4: Способность иммунных эффекторных клеток осуществлять IMAB362-опосредованный ADCC не нарушается обработкой химиотерапевтическими препаратами

Химиотерапевтические средства, использованные в режимах EOF или FLO, являются сильнодействующими при ингибировании пролиферации клеток-мишеней. Для изучения отрицательного действия химиотерапии на эффекторные клетки, PBMCS от здоровых 45 доноров обрабатывали 10 нг/мл эпирубицина, 500 нг/мл оксалиплатина и 10 нг/мл 5-FU (EOF) или 10 нг/мл 5-FU, 50 нг/мл фолиновой кислоты и 500 нг/мл оксалиплатина (FLO) в течение 72 часов до проведения ADCC-анализов. Фигура 7a показывает значения

EC₅₀ 4^x здоровых доноров, а фигура 7b показывает характерные кривые зависимости доза-эффект IMAV362-индуцированного ADCC с использованием эффекторных клеток, предварительно обработанных EOF или FLO. IMAV362-индуцированный ADCC клеток

рака желудка NUGC-4 не нарушается в связи с химиотерапией EOF или FLO.

Пример 5: Комбинация обработки ZA/IL-2 приводит к оптимизированному увеличению культивированных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC)

Действие ZA/IL-2 на пролиферацию культивируемых PBMC была оценена *in vitro*.

PBMC получали от здоровых людей-доноров, и культуры обрабатывали однократной дозой ZA. IL-2 добавляли каждые 3-4 дня. Конкретно, полученные от 3 разных здоровых

доноров PBMC (#1, #2, #3) культивировали в среде RPMI (1×10⁶ клеток/мл) в течение 14 дней с 1 мкМ ZA плюс высокая (300 U/мл) или низкая (25 U/мл) доза IL-2; см. фигуру 8a. PBMC одних и тех же доноров культивировали дополнительно в среде RPMI в течение 14 дней с 300 U/мл IL-2 плюс ZA или без ZA; см. фигуру 8b. Увеличение

количества клеток определяли, подсчитывая живые клетки в дни 6, 8, 11 и 14.

В среде с добавлением высокой дозы IL-2 количество клеток увеличивалось примерно в 2-5 раз по сравнению с культурами с добавлением низкой дозы IL-2 (фигура 8a). Рост клеток в среде без ZA был приблизительно в 2 раза ниже по сравнению с клетками, растущими в среде с ZA (фигура 8b). Эти результаты показывают необходимость использования двух соединений ZA и IL-2 в комбинации для обеспечения надлежащего размножения клеток.

Пример 6: Обработка ZA/IL-2 приводит к повышенному росту Vγ9Vδ2 Т-клеток в PBMC-культурах

PBMC культивировали в течение 14 дней в среде RPMI с добавлением 300 U/мл IL-2 и с или без 1 мкМ ZA. Процент Vγ9+Vδ2+ Т-клеток в пределах популяции лимфоцитов CD3+ (фигура 9a) и процент CD 16+ клеток в пределах CD3+Vγ9+Vδ2+ Т-клеточной популяции (фигура 9b) определяли с помощью многоцветного FACS-анализа в дни 0 и 14. Результаты для каждого донора оценивали в диаграмме рассеяния. На фигуре 9c представлена диаграмма рассеяния, показывающая увеличение в течение времени (обогащение) количества CD3+ Vγ9+Vδ2+ и CD3+CD16+ Vγ9+Vδ2+ Т-клеток в пределах популяции лимфоцитов. Учитывали количество клеток, посеянных в день 0, и количество клеток, собранных в 14 день.

Добавление IL-2 в PBMC-культуры необходимо для выживания и роста лимфоцитов. Они эффективно растут в культурах с добавлением 300 U/мл IL-2. FACS-анализ с использованием Vγ9 и Vδ2 специфических антител показал, что добавление ZA/IL-2 специфически вызывает накопление Vγ9Vδ2 Т-клеток (фигура 9a). Через 14 дней CD3+ популяция лимфоцитов может содержать до 80% Vγ9Vδ2 Т-клеток. Часть Vγ9Vδ2 Т-клеток экспрессирует CD 16, тогда как обогащение этих клеток в пределах CD3+ популяции лимфоцитов является 10-700-кратным в зависимости от донора (фигуры 9b и 9c). Обогащение CD16+Vγ9+Vδ2+ Т-клеток в культурах в 10-600 раз выше по сравнению с культурами, растущими без ZA (фигура 9c). Мы сделали вывод, что обработка ZA/IL-2 PBMCs *in vitro* приводит к усилению экспрессии ADCC-опосредующего FcγIII рецептора CD16 в значительной части γδ Т-клеток.

Пример 7: IL-2 влияет на рост Vγ9Vδ2 Т-клеток дозо-зависимым образом

Добавление ZA в культуры является наиболее важным фактором стимулирования развития Vγ9Vδ2 Т-клеток. Хорошо известно, что для роста и выживания Т-клеток требуется IL-2.

PBMC культивировали в течение 14 дней в среде RPMI с добавлением 1 мкМ ZA и

возрастающих концентраций IL-2. IL-2 добавляли в дни 0 и 4. Обогащение CD16+V γ 9+V δ 2+ Т-клеток в пределах популяции лимфоцитов CD3+ определяли с помощью многоцветного FACS анализа в дни 0 и 14. Для сравнения разных доноров количество CD16+V γ 9+V δ 2+ Т-клеток, собранных после культивирования с 600 U/мл IL-2, было
 5 взято за 100%; см. фигуру 10, слева. Кроме того, была проверена ADCC-активность изолированных культур, выращенных за 14 дней в увеличивающихся концентрациях IL-2; см. фигуру 10, справа.

Проведение дозо-зависимого анализа подтвердило, что IL-2 также стимулирует рост и выживаемость подгруппы V γ 9V δ 2 Т-клеток. При добавлении низких концентраций
 10 IL-2 в среду была обнаружена корреляция между дозой IL-2 и процентом CD16+V γ 9V δ 2 Т-клеток в пределах популяции лимфоцитов CD3+ (фигура 10, слева). ADCC-активность клеток, выращенных при более высоких концентрациях IL-2 (150-600 U/мл), лучше по сравнению с клетками, выращенными при низких концентрациях IL-2 (фигура 10, справа).

15 Пример 8: Z A вызывает выработку ИРР в моноцитах и раковых клетках, стимулируя увеличение У γ 9У62 Т-клеток

Свежие PBMCs (Exp. #1) или 14-дневные, стимулированные ZA/IL-2 культуры V γ 9V δ 2 Т-клеток (Exp. #2-5), инкубировали или без моноцитов (отношение эффектор:моноцит 1:0), с 0.2-кратным (4:1) или 5-кратным (отношение 1:4) количеством моноцитов + 1
 20 мкМ Z A. Увеличение V γ 9V δ 2 Т-клеток в совместных культурах через 14 дней определяли с помощью многоцветного FACS-анализа, при этом увеличение культуры учитывали при подсчете. Коэффициент обогащения V γ 9V δ 2 Т-клеток, культивированных с моноцитами в соотношении 1:4, был взят за 100% для каждого эксперимента.

Увеличение моноцитов в культуре приводило к обогащению V γ 9V δ 2 Т-клеток более,
 25 чем в 10 раз. Этот эффект был явно ZA-зависимым; см. фигуру 11а.

Кроме того, клетки рака желудка человека (NUGC-4-люцифераза) и мышинные клетки рака желудка (окрашенные кальцеином CLS103) были предварительно обработаны с или без 5 мкМ ZA в течение 2 дней. Человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, выделенные с помощью MACS (день 14), совместно культивировали с раковыми клетками в течение
 30 24 часов. Цитотоксичность V γ 9V δ 2 Т-клеток по отношению к необработанным и ZA-обработанным клеткам-мишеням определяли путем измерения оставшейся активности люциферазы или флуоресценции кальцеина; см. фигуру 11b. Клетки-мишени (NUGC-4 и CLS103) предварительно обрабатывали с или без 5 мкМ ZA в течение 2 дней и потом инкубировали в течение 4 часов с митомицином C (50 MI) для остановки пролиферации.
 35 MACS-очищенные человеческие 14-дневные находящиеся в покое V γ 9V δ 2 Т-клетки и Н-тимидин добавили к клеткам-мишеням и совместные культуры инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Пролиферацию определяли, измеряя включение 3Н тимидина в ДНК с помощью сцинтилляционного счетчика MicroBeta. Пролиферация клеток-мишеней, не обработанных ZA и без V γ 9V δ 2 Т-клеток, была принята за 100%; см.
 40 фигуру 11c.

Как видно на фигурах 11b и 11c, ZA-активированные клетки рака человека активировали V γ 9V δ 2 Т-клетки, имея в виду цитотоксичность (5-10 раз) и пролиферацию (1.4-1.8 раз), тогда как линия раковых клеток мыши CLS103 не оказывала таких воздействий на V γ 9V δ 2 Т-клетки.

45 Пример 9: Обработка ZA/IL-2 влияет на состав культур PBMC Рост и дифференцировка специфических типов клеток в PBMC культурах зависит от присутствия цитокинов. Эти компоненты или добавляют к среде (например, факторы роста, присутствующие в сыворотке, IL-2) или их секретируют сами иммунные клетки.

Какой тип клеток развивается, также зависит от исходного состава PBMCs и генетической базы. Чтобы проанализировать общее увеличение эффекторных клеток (NK клетки и V γ 9V δ 2 Т-клетки), PBMC 10 разных доноров выращивали в присутствии 300 U/мл IL-2 вместе с или без 1 мкМ ZA в течение 14 дней. Количество эффекторных

5 клеток в популяции лимфоцитов было установлено с помощью многоцветного FACS окрашивания с использованием CD3, CD16, CD56, V δ 9 и V δ 2 антител. CD3-CD56+CD16+ клетки представляют NK-клетки, и CD3+V γ 9+V δ 2+ представляют V γ 9V δ 2 Т-клетки.

Многоцветный FACS-анализ показал, что после обработки IL-2 развиваются в основном NK-клетки, тогда как в культурах, обработанных ZA/IL-2, преимущественно

10 увеличивается количество V γ 9V δ 2 Т-клеток (фигура 12).

Пример 10: ZA/IL-2 обработка порождает V γ 9V δ 2+ эффекторные клетки памяти

Субпопуляции Т лимфоцитов могут быть разграничены с помощью двух поверхностных маркеров, изоформы с высоким молекулярным весом антигена лимфоцитов CD45RA и рецептора хемокинов CCR7. CCR7+ наивные и Т-клетки

15 центральной памяти (СМ) отличаются способностью многократно циркулировать в лимфатические узлы и наталкиваться на антиген. В противоположность этому, эффекторные клетки памяти (ЕМ) и эффекторные Т-лимфоциты RA+ (TEMRA) подавляют CCR7 и, по-видимому, специализируются в миграции к периферическим

нелимфоидным тканям, например, в инфицированные участки или опухолевые участки.

20 Клетки ЕМ можно дополнительно подразделить, исходя из характерной CD27 и CD28 экспрессии. Прогрессирующая потеря CD28 и CD27 поверхностной экспрессии сопровождается активизацией цитолитической способности клеток. Кроме того, уровень CD57 коррелирует с экспрессией гранзимов и перфоринов и таким образом представляет собой третий маркер, показывающий цитотоксичность/созревание клетки.

PBMC культивировали с или без 1 мкМ ZA и 300 U/мл IL-2 в течение 14 дней. Экспрессию различных поверхностных маркеров определяли с помощью многоцветного FACS-анализа на день 0 (PBMCs) и день 14. Наивные клетки являются CD45RA+ CCR7+, клетки центральной памяти (СМ) являются CD45RA- CCR7+, TEMRA являются CD45RA+ CCR7- и эффекторные клетки памяти (ЕМ) являются отрицательными в отношении

30 обоих маркеров; см. фигуру 13а. Кроме того, цитолитическая активность V γ 9V δ 2 Т-клеток была определена окрашиванием в отношении CD27 и CD57 маркеров; см. фигуру 13b, с. В дополнение к этому, развитие NK-подобных свойств, важных для ADCC-активности, было проанализировано окрашиванием CD3+ клеток CD16 (связывание антитела) и CD56 (адгезия); см. фигуру 13d.

Многоцветный FACS-анализ V γ 9V δ 2 Т-клеток показал, что ZA/IL-2 обработка явно стимулирует развитие V γ 9V δ 2 Т-клеток ЕМ типа, которые представляют собой CD27- и CD57+ (фигура 13b-с). В дополнение к увеличенной цитолитической активности в популяции CD3+ наблюдалось увеличение уровня CD 16 и CD56, которые, как известно, происходят от NK-клеток (CD3-CD16+CD56+) и являются вовлеченными в ADCC,

40 (фигура 13d).

Взяты вместе, эти данные означают, что ZA-обработка PBMCs приводит к развитию CD16+V γ 9+V δ 2+ эффекторных клеток памяти, которые способны мигрировать к периферическим нелимфоидным тканям и которые демонстрируют маркеры высокой цитолитической активности. В комбинации с IMAB362, нацеленными на опухоль

45 антителами, эти клетки являются очень хорошо приспособленными для того, чтобы мигрировать, нацеливаться и уничтожать опухолевые клетки.

Пример 11: выращенные в присутствии ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 Т-клетки являются сильными эффекторами для IMAB362-опосредованного CLDN18.2-зависимого ADCC

Подобно NK-клеткам, выращенные в присутствии ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 Т-клетки являются положительными в отношении CD 16 (смотри фигуры 9 и 13), рецептор Fc γ RIII, через который антитело, связанное с клеткой, запускает ADCC. Чтобы оценить, способны ли V γ 9V δ 2 Т-клетки вызывать сильный ADCC в сочетании с IMAB362 была проведена серия экспериментов.

PBMC, полученные от 2 разных доноров (#1 и #2), культивировали в среде с 300 U/мл IL-2 и с или без 1 мкМ ZA. Через 14 дней клетки собирали и добавляли увеличивающиеся концентрации (0.26 нг/мл-200 мкг/мл) IMAB362 к NUGC-4 клеткам, экспрессирующим CLDN18.2. Специфическое уничтожение определяли с помощью люциферазного анализа; см. фигуру 14а. Фигура 14b, с дает общее представление о ADCC-анализах, проведенных с использованием клеток от 27 доноров, выросших в 300 U/мл IL-2 и с или без ZA. NUGC-4 служили клетками-мишенями. Для каждого донора значения EC₅₀ (b) вычисляли из дозо-зависимых кривых, и уровни максимального специфического уничтожения в дозе от 200 мкг/мл IMAB362 (c) отмечали в диаграммах рассеяния.

Сильная IMAB362-зависимая ADCC активность наблюдалась в отношении CLDN18.2-положительных NUGC-4 клеток при использовании PBMC, культивированных в течение 14 дней с ZA/IL-2 (фигура 14а). При использовании ZA/IL-2-обработанных PBMC культур ADCC зависит от присутствия V γ 9V δ 2 Т-клеток (фигуры 12 и 15). Если клетки культивировали без ZA, ADCC активность понижалась в культурах от большинства доноров. В этих культурах остаточная ADCC-активность является зависящей от NK-клеток (фигуры 11 и 14). При тестировании более 20 доноров ADCC-анализ показал, что ZA/IL-2 обработка PBMCs улучшает EC₅₀ и уровень максимального специфического уничтожения по сравнению с PBMC, культивированными только с IL-2.

Кроме того, PBMC двух разных доноров (#1 + #2) культивировали с 1 мкМ ZA и 300 U/мл IL-2. Эти культуры эффекторных клеток использовали в ADCC-анализах с использованием CLDN18.2-положительных (NUGC-4, Kato III) и отрицательных (SK-BR-3) линий клеток-мишеней человека (Е:Т отношение 40:1). Были добавлены увеличивающиеся количества (0.26 нг/мл-200 мкг/мл) IMAB362 антител. ADCC измеряли, используя люциферазный метод; см. фигуру 15а. Такой же эксперимент, как описанный в (а), был проведен с NUGC-4 клетками-мишенями и эффекторными клетками, собранными из культур, обработанных ZA/IL-2 в разные моменты времени; см. фигуру 15b. Такой же эксперимент, как описанный в (а), был проведен с использованием NUGC-4 в качестве клеток-мишеней; см. фигуру 15 с. Выращенные в присутствии ZA/IL-2 клетки или использовали непосредственно, или V γ 9V δ 2 Т-клетки были выделены из культур с использованием TCR γ δ MACS сортировки (Miltenyi Biotech). Степень чистоты V γ 9V δ 2 Т-клеток в лимфоцитах составляла более чем 97.0%.

Наблюдалась сильная ADCC активность в отношении CLDN18.2-положительных линий опухолевых клеток человека, но не наблюдалась в отношении CLDN18.2-отрицательных линий опухолевых клеток (фигура 15а). Кроме того, не была обнаружена ADCC-активность при использовании изотопических контрольных антител (не показано). В процессе ZA/IL-2 обработки ADCC литическая активность увеличивается в течение времени для фракции доноров (фигура 15b). Кривая доза-эффект IMAB362 сдвигается вверх и влево, показывая лучшие значения EC₅₀ и уровни максимального лизиса с течением времени. По сравнению с unconditioned PBMC, V γ 9V δ 2 эффекторные Т-клетки, обогащенные с помощью ZA/IL-2обработки, способны достигать более высокого уровня уничтожения CLDN18.2-положительных клеток-мишеней, кроме того

они требуют более низких концентраций IMAB362 для того же самого уровня уничтожения.

Чтобы подтвердить, что Vγ9Vδ2 Т-клетки являются резервуаром литической активности, эти клетки изолировали со степенью чистоты >97% с помощью магнитной сортировки клеток из популяций РВМС, культивированных с ZA/IL-2, на 14 день. ADCC-активность в сочетании с IMAB362 сохраняется и отчасти улучшается вследствие более высокой чистоты. Эти результаты подтверждают, что Vγ9Vδ2 Т-клетки несут основную ответственность за ADCC-активность, исследованную при использовании 14-дневных РВМС культур (фигура 15с).

Пример 12: ZA/IL-2-обработка линий клеток-мишеней не влияет на поверхностную экспрессию CLDN18.2

Инициированные IMAB362 механизмы действия строго зависят от присутствия и количества внеклеточного обнаружимого CLDN18.2. Поэтому влияние обработки ZA/IL-2 на плотность CLDN18.2 на поверхности было проанализировано с помощью проточной цитометрии с использованием клеточных линий NUGC-4 и Kato III с эндогенной экспрессией CLDN18.2. В частности, был проведен проточный цитометрический анализ связывания IMAB362 на непримеабилитированных клетках NUGC-4 рака желудка, предварительно обработанных ZA/IL-2 или ZA/IL-2+EOF или ZA/IL-2+5-FU/OX в течение 72 часов.

ZA/IL-2 обработка *in vitro* не вызывает изменения количества поверхностно локализованного CLDN18.2; см. фигуру 16.

Пример 13: Увеличение ADCC, опосредованного IMAB362, с помощью ZA/IL-2-обработки РВМС не нарушается предварительной обработкой EOF

Химиотерапевтические средства нарушают пролиферацию клеток. В противоположность этому ZA/IL-2-обработка инициирует увеличение количества Vγ9Vδ2 Т-клеток. Чтобы проанализировать влияние этих противоположных воздействий на эффекторные клетки, РВМС от 6 здоровых доноров культивировали с ZA/IL-2 или ZA/IL-2+EOF в течение 8 дней до использования в ADCC-анализах (Е:Т отношение 15:1). Были определены IMAB362 концентрации, приводящие к 50% ADCC-опосредованному лизису необработанных NUGC-4 клеток-мишеней (EC₅₀).

Значительного изменения (прироста) ADCC, вызванного IMAB362, NUGC-4-клеток вследствие обработки РВМС ZA/IL-2 не наблюдается при комбинированной обработке с EOF (фигура 17).

Пример 14: *In vivo* нацеливание IMAB362 на CLDN18.2-положительные опухоли и противоопухолевые эффекты IMAB362 на ксенотрансплантатах опухолевых клеток на «голых» мышах

Для исследования *in vivo* IMAB362-нацеливания на опухолевые клетки 80 мкг Dyelight[®] 680-меченого антитела вводили внутривенно «голым» мышам с подкожными ксенотрансплантатами клеток рака желудка человека NUGC-4. NUGC-4 клетки демонстрируют поверхностную экспрессию CLDN18.2, а также HER2/neu (мишень трастузумаба), но являются отрицательными в отношении CD20. В контрольных исследованиях группам мышей с NUGC-4-ксенотрансплантатами вводили или Dyelight 680-меченый трастузумаб (группа положительный контроль) или Dyelight[®] 680-меченый ритуксимаб (отрицательный контроль). IMAB362 накапливается выраженно и исключительно в ксенотрансплантатах опухолей, что показано визуализацией на живых мышах с использованием флуоресцентной системы визуализации Xenogen[®] через 24 часа после внутривенной инъекции антител (фигура 18). IMAB362 эффективно

удерживается в мишень-положительной опухоли и обнаруживается с соизмеримой интенсивностью даже через 120 часов (фигура 18). Трастузумаб также обнаруживается исключительно в ксенотрансплантатах через 24 часа после инъекции. Сигнал трастузумаба быстро «размывается» в пределах 120 часов после инъекции. При использовании ритуксимаба сигнал не обнаруживается.

Кроме того, IMAB362 использовали для лечения мышей с ксенотрансплантатами CLDN18.2-положительных опухолей. Было проведено исследование, связанное с ранним лечением модели опухоли (с началом введения IMAB362 через 3 дня после инокулирования опухолевых клеток). Более того, эксперименты, связанные с лечением развитых опухолей, начинали через 9 дней после инокулирования опухолевых клеток, когда опухоли достигали объемов около 60-120 мм³.

«Голым» мышам подкожно инокулировали 1×10⁶ НЕК293-CLDN18.2 трансфектантов. Через 3 дня после инокулирования опухоли начинали лечение мышей (10 на группу). Мышам вводили 200 мкг IMAB362, инфликсимаб (в качестве изотипического контроля) и PBS два раза в неделю в течение 6 недель, чередуя внутривенный и внутрибрюшинный способ введения. В то время как все мыши в группах, получавших или PBS или изотипический контроль, погибали в пределах 70-80 дней, животные, леченые IMAB362, имели преимущество по продолжительности жизни (фигура 19). Наблюдалось не только увеличение времени до гибели, а кроме того 4 из 10 мышей оставались живыми в течение всего периода наблюдения 210 дней.

Лечение 9-10 мышей на группу начинали, когда средние объемы опухоли достигали 88 мм (62-126 мм³). До лечения мыши были разделены на тестируемые группы с целью обеспечения сравнимых размеров опухолей во всех группах. Мышей лечили 200 мкг IMAB362, изотопическим контролем или PBS два раза в неделю в течение 6 недель, чередуя внутривенное и внутрибрюшинное введение. Все мыши в группах, которых обрабатывали или PBS или изотопическим контролем, погибли в пределах 50-100 дней. Животные, леченые IMAB362 имели преимущество в выживаемости, при этом среднее время выживания почти удваивалось (47 против 25 дней). Три из этих мышей оставались живы в течение полного периода наблюдения (фигура 20). Важно отметить, что противоопухолевая эффективность *in vivo* зависит от присутствия мишени на опухолевых клетках. Противоопухолевые эффекты IMAB362-обработки не были отмечены на мышцах с ксенотрансплантатами CLDN18.2-отрицательных НЕК293 опухолевых клеток.

Для изучения эффективности IMAB362 в отношении раковых клеток с эндогенной экспрессией CLDN18.2 использовали NUGC-4-модель рака желудка. Наблюдался агрессивный рост клеток NUGC-4 у «голых» мышей.

1×10⁷ клеток NUGC-4 рака желудка вводили подкожно в левый бок бестимусных «голых» мышей (n=9 для IMAB362 группы; n=8 для контрольных групп). IMAB362 (200 мкг на инъекцию) и контроли вводили два раза в неделю, чередуя *i.v.* и *i.p.*, начиная через 6 дней после инокулирования опухоли с помощью внутривенной инъекции. Размеры опухоли определяли два раза в неделю. Представленные на фигуре 21a результаты показаны вместе с SEM. Рост опухолей у мышей, леченых IMAB362, был существенно ингибирован по сравнению с контрольными группами мышей (*p<0.05). Фигура 21b показывает объемы опухолей на 21 день после инокуляции опухоли. Объемы опухолей у мышей, которых лечили IMAB362, были значительно меньше, чем объемы опухолей у контрольных мышей (*p<0.05).

При инокулировании мышам 1×10⁷ опухолевых клеток средняя продолжительность жизни нелеченых мышей не составляла больше 25 дней. Лечение IMAB362, цетуксимабом,

трастузумабом или изотопическим контролем и буферным контролем начинали, когда объемы опухоли достигали среднего размера около 109 мм^3 ($63\text{-}135 \text{ мм}^3$). Мышей разделили на лечебные группы с разными дозами (фигура 21). Было показано, что IMAB362 значительно уменьшает скорость роста опухоли. Значительного уменьшения роста опухоли по сравнению с контролями (физраствор или антители) не наблюдалось в отношении этой агрессивно растущей модели опухоли. Замедление роста опухоли было связано с незначительным увеличением среднего времени выживания у IMAB362-леченых мышей (31 день против 25 дней).

Противоопухолевую активность IMAB362 исследовали на двух моделях ксенотрансплантатов рака желудка человека с использованием NCI-N87 или NUGC-4 клеток с использованием лентивирусной трансдукции IMAB362 мишени CLDN18.2 (NCI-N87~CLDN18.2 и NUGC-4~CLDN18.2).

NCI-N87-CLDN18.2 опухолевые ксенотрансплантаты инокулировали подкожной инъекций 1×10^7 NCI-N87-CLDN18.2 клеток в бок 8 «голых» мышей (самки, 6-недельного возраста) на лечебную группу. Обработку начинали на 5 день после инокулирования опухоли с помощью внутривенной инъекции 800 мкг IMAB362 или 200 мкл 0.9% NaCl в контрольной группе (физраствор). Внутривенное введение проводили еженедельно в течение всего периода наблюдения. Размер опухоли и состояние здоровья животных регистрировали два раза в неделю. Фигура 22a показывает эффекты обработки IMAB362 на рост опухоли. Размер подкожных опухолей измеряли два раза в неделю (среднее + SEM, *** $p < 0.001$). Фигура 22b показывает графики выживаемости Каплана-Мейера. Мышей забивали, когда опухоли достигали размера 1400 мм^3 .

Таким образом, длительная IMAB362-обработка высоко значимо ингибировала ($p < 0.001$) опухолевый рост NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантатов рака желудка (фигура 22a). Задержка роста опухоли была значимо ($p < 0.05$) связана с более длительным временем выживания мышей, леченых IMAB362 (фигура 22b).

IMAB362 иммунотерапия быстрорастущих NUGC-4~CLDN18.2 ксенотрансплантатов приводила к значимому ($p < 0.05$) уменьшению размеров опухолей на 14 день лечения. После первых двух недель IMAB362-лечения развитие NUGC-4~CLDN18.2 опухоли было очень агрессивным. Однако, ингибирование роста NUGC-4~CLDN18.2 опухоли до 14 дня лечения приводило к значимо ($p < 0.05$) более длительной выживаемости мышей, леченых IMAB362.

В итоге, IMAB362 было высоко эффективно при лечении ксенотрансплантатов карциномы желудка, демонстрируя значимую задержку развития опухоли и длительное выживание на опухолевых моделях, положительных в отношении эндогенного CLDN18.2. На моделях очень агрессивных опухолей эти противоопухолевые эффекты IMAB362 являются менее выраженными, но, тем не менее, значительными, что подчеркивает сильные противоопухолевые свойства IMAB362.

Пример 15: Противоопухолевые эффекты IMAB362 в сочетании с химиотерапией на мышинных моделях опухолей

In vitro, IMAB362-опосредованный ADCC является более эффективным на клетках рака желудка человека, предварительно обработанных комбинациями химиотерапевтических средств, включая EOF и 5-FU + OX. Поэтому, противоопухолевое действие комбинации этих соединений с IMAB362 было исследовано на мышинных опухолевых моделях in vivo.

NCI-N87~CLDN18.2 ксенотрансплантаты опухолей инокулировали с помощью подкожной инъекции 1×10^7 NCI-N87~CLDN18.2 клеток в бок 9 мышей в каждой лечебной

группе. Мышей-опухоленосителей лечили в соответствии с режимом EOF - 1.25 мг/кг эпирубина, 3.25 мг/кг оксалиплатина и 56.25 мг/кг 5-фторурацила внутривенно в дни 4, 11, 18 и 25 после инокулирования опухоли, с последующей внутривенной инъекцией 800 мкг IMAV362 через 24 часа после введения химиотерапии. IMAV362-обработку продолжали еженедельно. Размер опухоли и состояние здоровья животных контролировали два раза в неделю. Фигура 23a показывает эффекты комбинированного лечения на рост опухоли. Размер подкожных опухолей измеряли два раза в неделю (среднее значение + SEM; * $p < 0.05$). Фигура 23b показывает графики выживаемости Каплана-Мейера. Мышей забивали, когда объем опухоли достигал 1400 мм³.

У «голых» мышей с опухолью NCI-N87~CLDN18.2 при лечении IMAV362 или EOF режимом наблюдалось высокозначимое подавление роста опухоли по сравнению с контрольными мышами. Дополнительное IMAV362 лечение в комбинации с EOF химиотерапией приводило к значимо ($p < 0.05$) более сильному ингибированию роста опухоли, чем лечение EOF режимом в отдельности (фигура 23a). Медиана выживаемости мышей в контрольной группе (физрастор) составляла 59 дней. Еженедельное IMAV362-лечение мышей значительно увеличивало медиану выживаемости до 76 дней, подобно выживаемости мышей в EOF группе с медианой выживаемости тоже 76 дней. Однако комбинированное лечение IMAV362 и EOF увеличивало медиану выживаемости до 81 дня (фигура 23b).

Ксенотрансплантаты опухолей инокулировали подкожной инъекцией 1×10^7 NUGC-4~CLDN18.2 клеток в бок 10 «голым» мышам (самки, 6-недельного возраста) на лечебную группу. Мышей лечили в дни 3, 10, 17 и 24 химиотерапевтическими средствами. IMAV362-обработку проводили еженедельно. Фигура 24a показывает кривые роста подкожных ксенотрансплантатов NUGC-4~CLDN18.2 опухолей (среднее + SEM). Фигура 24b представляет графики выживаемости Каплана-Мейера (логарифмический ранговый (Кокса-Мантеля) тест, ** $p < 0.01$).

Подкожные ксенотрансплантаты NUGC-4~CLDN18.2 опухолей развивались очень агрессивно. Тем не менее, IMAV362-лечение мышей-опухоленосителей значительно ингибировало рост опухоли по сравнению с контрольной группой с введением физраствора. При использовании комбинированной терапии EOF, эффекты IMAV362 на рост опухоли NUGC-4~CLDN18.2 были скрыты ингибированием роста вследствие EOF-лечения, не показывая увеличения ингибирования роста опухоли по сравнению с лечением EOF в отдельности (фигура 24a). Однако медиана выживаемости мышей, леченых IMAV362 и EOF режимом, была увеличена с высокой значимостью ($p < 0.01$) по сравнению с выживаемостью мышей, которых лечили только EOF (фигура 24b).

Пример 16: Выращенные в присутствии ZA/IL-2 V γ 9V δ 2 Т-клетки улучшают IMAV362-опосредованный контроль развитых опухолей *in vivo*

Для исследования комбинированной активности IMAV362 и полученных в результате обработки ZA/IL-2 $\gamma\delta$ Т-клеток в мышинных системах мы использовали мышей NSG. У мышей NSG отсутствуют зрелые Т-клетки, В-клетки, натуральные киллеры (NK), сигнальные пути многих цитокинов, и они имеют множество дефектов врожденного иммунитета, при том, что ниши в первичной и вторичной иммунологических тканях являются доступными для колонизации человеческими иммунными клетками.

NSG мышам подкожно инокулировали 1×10^7 CLDN18.2-трансфицированных HEK293 клеток. В тот же день мыши получали 8×10^6 человеческих PBMCs, обогащенных V γ 9V δ 2 Т-клетками, культивированными в течение 14 дней в среде с добавлением ZA. Более того, мышам вводили 50 мкг/кг ZA и 5000 U IL-2 (Proleukin). Для сохранения

человеческих Т-клеток в функциональном состоянии, IL-2 вводили два раза в неделю, а ZA - еженедельно. Когда HEK293~CLDN18.2 опухоли становились макроскопически видимыми, начинали лечение 200 мкг IMAB362 два раза в неделю. В дополнение к группе из 9 леченых мышей, были взяты также две контрольные группы мышей. Одна группа не получала человеческие $\gamma\delta$ Т-клетки, другую группу лечили изотипическими контрольными антителами вместо IMAB362. Рост CLDN18.2-положительных опухолей у мышей, которых лечили IMAB362 в присутствии человеческих $\gamma\delta$ Т-клеток и ZA, был значимо ингибирован и практически прекращен, в то время как у мышей, которых лечили или изотипическими контрольными антителами, или у мышей, лишенных человеческих Т-клеточных эффекторов, опухоли росли агрессивно, и поэтому мышей забивали раньше положенного времени (фигура 25).

Пример 17: Противоопухолевые эффекты IMAB362 в комбинации с химиотерапией на мышинных опухолевых моделях

Противоопухолевая активность IMAB362 в комбинации с химиотерапией была исследована на подкожных аллотрансплантатах карциномы желудка у иммунокомпетентных беспородных NMRI мышей с использованием CLS-103 клеток с лентивирусной трансдукцией мышинового cldn18.2 (CLS-103~cldn18.2).

CLS-103~cldn18.2 аллотрансплантат опухоли инокулировали с помощью подкожной инъекции 1×10^6 CLS-103~cldn18.2 клеток в бок NMRI-мышей (10 мышей на каждую лечебную группу). Мышей-опухоленосителей лечили внутрибрюшным введением 1.25 мг/кг эпирубина, 3.25 мг/кг оксалиплатина и 56.25 мг/кг 5-фторурацила (EOF) в дни 3, 10, 17 и 24 после инокулирования опухоли, с последующей внутривенной инъекцией 800 мкг IMAB362 через 24 часа после введения химиотерапии. IL-2 вводили два раза в неделю с помощью подкожной инъекции 3000 IE. После завершения химиотерапии обработку IMAB362 и IL-2 продолжали в течение всего периода наблюдения. Размер опухоли и состояние здоровья животных контролировали два раза в неделю. Мышей забивали, когда опухоль достигала объема 1400 мм или когда появлялось изъязвление опухоли.

Как видно на фигуре 26, у NMRI мышей с CLS-103~cldn18.2 опухолями, лечеными IMAB362 или EOF по отдельности, не наблюдалось значимого ингибирования роста опухоли по сравнению с контрольной группой (физраствор). В противоположность этому, комбинация EOF химиотерапии и IMAB362-лечения приводила к значительно более высокому ингибированию роста опухоли и длительному выживанию мышей-опухоленосителей. Это наблюдения показывают наличие аддитивных (совокупных) или даже синергических (взаимно усиливающих) эффектов при комбинации EOF химиотерапии и IMAB362 иммунотерапии. Обработка IL-2 не оказывала действия на рост опухоли.

Applicant's or agent's file reference 342-71	International application No.
---	-------------------------------

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>40</u> , line <u>6</u> .	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depositary institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Date of deposit October 19, 2005	Accession Number DSM ACC2737
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
- Mouse (Mus musculus) myeloma P3X63Ag8U.1 fused with mouse (Mus musculus) splenocytes - Hybridoma secreting antibody against human claudin-18A2	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
(Blank space for designated states)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
(Blank space for separate furnishing of indications)	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998; reprint January 2004)

342-71 PCT

New International Patent Application

Ganymeu ruaimaeuticals AG, et al.

«COMBINATION THERAPY INVOLVING АНТИТЕЛА AGAINST CLAUDIN 18.2 FOR TREATMENT OF CANCER»

Our Ref.: 342-71 PCT

Дополнительный лист по поводу биологического материала

Установление дополнительных депозитов:

1) Название и адрес депозитного учреждения для депозитов (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748):

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig

DE

2) Название и адрес депозитного учреждения для депозитов (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810):

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Inhoffenstr. 7 B

38124 Braunschweig

DE

Дата депозитов	Инвентарные номера	Сделанные ниже указания относятся к депонированным микроорганизмам
19 октября 2005	DSM ACC2738	страница 40, строка 7
19 октября 2005	DSM ACC2739	страница 40, строка 8
19 октября 2005	DSM ACC2740	страница 40, строка 9
19 октября 2005	DSM ACC2741	страница 40, строка 10
19 октября 2005	DSM ACC2742	страница 40, строка 11
19 октября 2005	DSM ACC2743	страница 40, строка 12
17 ноября 2005	DSM ACC2745	страница 40, строка 13
17 ноября 2005	DSM ACC2746	страница 40, строка 14
17 ноября 2005	DSM ACC2747	страница 40, строка 15
17 ноября 2005	DSM ACC2748	страница 40, строка 16
26 октября 2006	DSM ACC2808	страница 40, строка 17
26 октября 2006	DSM ACC2809	страница 40, строка 18
26 октября 2006	DSM ACC2810	страница 40, строка 19

Дополнительные указания для всех вышеупомянутых депозитов:

- Мышиная (Mus musculus) миелома Р3Х63Ag8U.1, слитая с мышинными (Mus musculus) спленоцитами

- Гибридома, секретирующая антитело к человеческому клаудину-18A2 3)

Депозитарий:

Все вышеупомянутые депозиты были сделаны:

Ganymed Pharmaceuticals AG

Freiligrathstraße 12

55131 Mainz

DE

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения или предотвращения раковых заболеваний, ассоциированных с экспрессией CLDN18.2 на поверхности раковых клеток, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, в комбинации с цитотоксическим и/или цитостатическим средством, стабилизирующим

или увеличивающим экспрессию CLDN18.2, в эффективном количестве.

2. Способ по п. 1, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, включает препарат, вызывающий остановку клеточного цикла или накопление клеток в одной или более фазах клеточного цикла, предпочтительно в одной или более фазах клеточного цикла, отличных от G1-фазы, более предпочтительно в G2-фазе и/или S-фазе.

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, включает препарат, выбранный из группы, состоящей из антрациклинов, платиновых соединений, аналогов нуклеозидов, таксанов и аналогов камптотецина или его пролекарств и их комбинаций.

4. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, включает препарат, выбранный из группы, состоящей из эпирубина, оксалиплатина, цисплатина, 5-фторурацила или его пролекарств, доцетаксела, иринотекана и их комбинаций.

5. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, содержит комбинацию оксалиплатина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию цисплатина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и оксалиплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и цисплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного антрациклина и 5-фторурацила или его пролекарств, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и оксалиплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и цисплатина, комбинацию, по меньшей мере, одного таксана и 5-фторурацила или его пролекарств или комбинацию, по меньшей мере, одного аналога камптотецина и 5-фторурацила или его пролекарств.

6. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, является препаратом, вызывающим иммуногенную гибель клеток.

7. Способ по п. 6, в котором препарат, вызывающий иммуногенную гибель клеток, включает средство, выбранное из группы, состоящей из антрациклинов, оксалиплатина и их комбинаций.

8. Способ по любому из пп. 1, 2 или 7, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, содержит комбинацию эпирубина и оксалиплатина.

9. Способ по любому из пп. 1, 2 или 7, в котором способ включает введение, по меньшей мере, одного антрациклина, по меньшей мере, одного платинового соединения и, по меньшей мере, одного из 5-фторурацила и его пролекарств.

10. Способ по п. 3, в котором антрациклин выбирают из группы, состоящей из эпирубина, доксорубина, даунорубина, идарубина и валрубина, и предпочтительно является эпирубином.

11. Способ по п. 3, в котором платиновое соединение выбирают из группы, состоящей из оксалиплатина и цисплатина.

12. Способ по п. 3, в котором аналог нуклеозида выбирают из группы, состоящей из 5-фторурацила и его пролекарств.

13. Способ по п. 3, в котором таксан выбирают из группы, состоящей из доцетаксела и паклитаксела.

14. Способ по п. 3, в котором аналог камптотецина выбирают из группы, состоящей

из иринотекана и топотекана.

15. Способ по любому из пп. 1 или 2, который включает введение (i) эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила, (ii) эпирубина, оксалиплатина и капецитабина, (iii) эпирубина, цисплатина и 5-фторурацила, (iv) эпирубина, цисплатина и капецитабина или (v) фолиновой кислоты, оксалиплатина и 5-фторурацила.

16. Способ по п. 1, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, выбрано из группы, состоящей из (i) оксалиплатина и 5-фторурацила, (ii) эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила, (iii) 5-фторурацила, фолиевой кислоты и оксалиплатина, (iv) иринотекана, (v) доцетакселя и (vi) цисплатина и их пролекарств.

17. Способ по любому из пп. 1 или 2, который дополнительно включает введение средства, стимулирующего $\gamma\delta$ Т-клетки.

18. Способ по п. 17, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой V γ 9V δ 2 Т-клетки.

19. Способ по п. 17, в котором средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, является бисфосфонатом.

20. Способ по п. 17, в котором средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, является азотсодержащим бисфосфонатом (аминобисфосфонатом).

21. Способ по п. 17, в котором средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, выбирают из группы, состоящей из золендроновой кислоты, клодроновой кислоты, ибандроновой кислоты, памидроновой кислоты, ризедроновой кислоты, минодроновой кислоты, олпадроновой кислоты, алендроновой кислоты, инкадроновой кислоты и их солей.

22. Способ по п. 17, в котором средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, вводится в комбинации с интерлейкином-2.

23. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с первой внеклеточной петлей CLDN18.2.

24. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, опосредует уничтожение клетки с помощью одного или более из числа опосредованного комплементзависимой цитотоксичностью (CDC) лизиса, опосредованного антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (ADCC) лизиса, индукции апоптоза и ингибирования пролиферации.

25. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, является антителом, выбранным из группы, состоящей из (i) антитела, выработанного и/или полученного от клона, депонированного под учетным номером DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 или DSM ACC2810, (ii) антитела, которое является химерной или гуманизированной формой антитела в соответствии с (i), (iii) антитела, обладающего специфичностью антитела в соответствии с (i), и (iv) антитела, содержащего антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающий центр, в частности варибельную область антитела в соответствии с (i), и предпочтительно обладающего специфичностью антитела в соответствии с (i).

26. Способ по любому из пп. 1 или 2, который включает введение антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, в дозе до 1000 мг/м².

27. Способ по любому из пп. 1 или 2, который включает введение антитела, обладающего способностью связываться с CLDN18.2, многократно в дозе от 300 до 600 мг/м².

28. Способ по любому из пп. 1 или 2, где рак является CLDN18.2-положительным.

29. Способ по любому из пп. 1 или 2, где рак является аденокарциномой, в частности развитой аденокарциномой.

30. Способ по любому из пп. 1 или 2, где рак выбирают из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, в частности рака нижнего отдела пищевода, рака
5 гастроэзофагиального соединения и гастроэзофагиального рака.

31. Способ по любому из пп. 1 или 2, где пациент является пациентом с отрицательным статусом по HER2/neu или пациентом с положительным статусом по HER2/neu, но не подходящим для лечения трастузумабом.

32. Способ по любому из пп. 1 или 2, где CLDN18.2 имеет аминокислотную
10 последовательность согласно SEQ ID NO: 1.

33. Медицинский препарат для лечения или предотвращения раковых заболеваний, ассоциированных с экспрессией CLDN18.2 на поверхности раковых клеток, включающий антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, и цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию
15 CLDN18.2 в эффективном количестве.

34. Медицинский препарат по п. 33, который дополнительно включающий средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки.

35. Набор для лечения или предотвращения раковых заболеваний, ассоциированных с экспрессией CLDN18.2 на поверхности раковых клеток, включающий первый
20 контейнер, содержащий антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, и контейнер, содержащий цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, и необязательно контейнер, содержащий средство, стимулирующее $\gamma\delta$ Т-клетки, в эффективном количестве.

36. Медицинский препарат по любому из пп. 33 или 34, дополнительно включающий
25 напечатанные инструкции по применению препарата или набора для лечения рака.

37. Медицинский препарат по п. 33 или 34, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, выбрано из группы, состоящей из (i) оксалиплатина и 5-фторурацила, (ii) эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила, (iii) 5-фторурацила, фолиевой кислоты и оксалиплатина,
30 (iv) иринотекана, (v) доцетакселя и (vi) цисплатина и их пролекарств.

38. Набор по п. 35, дополнительно включающий напечатанные инструкции по применению набора для лечения рака.

39. Набор по п. 35 или 38, в котором цитотоксическое и/или цитостатическое средство, стабилизирующее или увеличивающее экспрессию CLDN18.2, выбрано из группы,
35 состоящей из (i) оксалиплатина и 5-фторурацила, (ii) эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила, (iii) 5-фторурацила, фолиевой кислоты и оксалиплатина, (iv) иринотекана, (v) доцетакселя и (vi) цисплатина и их пролекарств.

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> COMBINATION THERAPY INVOLVING ANTIBODIES AGAINST CLAUDIN 18.2 FOR TREATMENT OF CANCER

<130> 342-71 PCT

<150> PCT/EP2012/002210

<151> 2012-05-23

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Страница 1

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 2
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
Страница 2

<210>	3
<211>	10
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 3

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

```
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 4

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

```
<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 5

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

<210>	6
<211>	13
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
Страница 4

20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 11
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 12

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 13

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 13

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1 5 10 15

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Страница 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 14
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 14

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 15

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 15

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

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

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

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

Страница 9

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Страница 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 16

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

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

Lys
465

<210> 17
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 17

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

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

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

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

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

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

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

Страница 13

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

Страница 14

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 18
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 19

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 19

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
50 55 60

Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr
65 70 75 80

Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser
85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Страница 17

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

Страница 18

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 20

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Страница 20

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

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

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

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

<210> 22

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Страница 22

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Страница 24

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

Страница 25

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 <210> 27
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
 <400> 27
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Страница 26

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240
 <210> 28
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of artificial sequence: chimeric monoclonal antibody
 <400> 28
 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

Страница 28

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 31

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

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

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

Страница 29

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 34

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
 20 25 30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
 50 55 60

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
 65 70 75 80

Страница 31

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 36

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

Страница 33

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 38

```

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

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

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

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

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

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

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

```

Lys

<210> 39

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 39

```

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

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

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

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

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

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

```

Страница 34

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

Lys

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product
<400> 41

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

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

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

Страница 35

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

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

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

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

Lys

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

Страница 36

<220>
 <223> Description of artificial sequence: Translation of PCR product

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Epitope

<400> 44

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

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Epitope

<400> 45

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

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

Страница 37

<223> Epitope

<400> 46

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope

<400> 47

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope

<400> 48

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitope

<400> 49

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

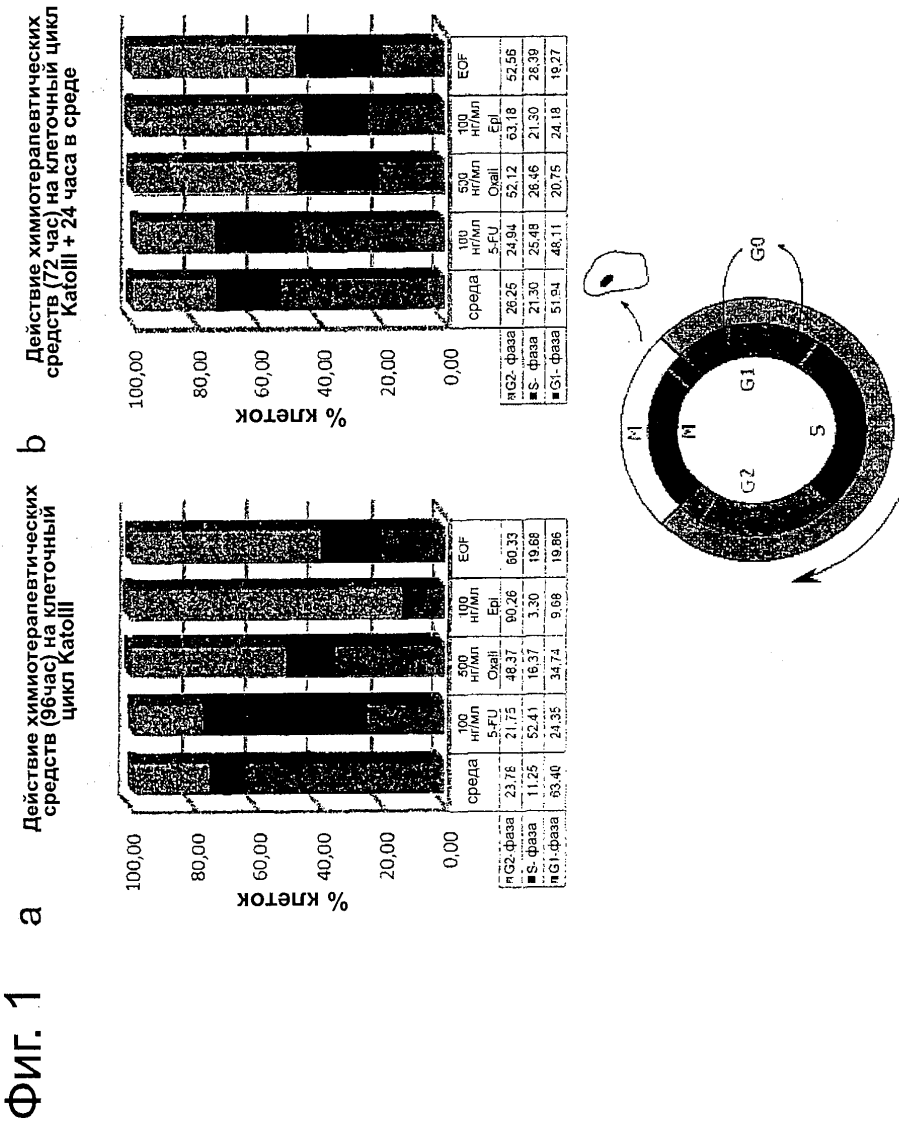
<213> Artificial

<220>

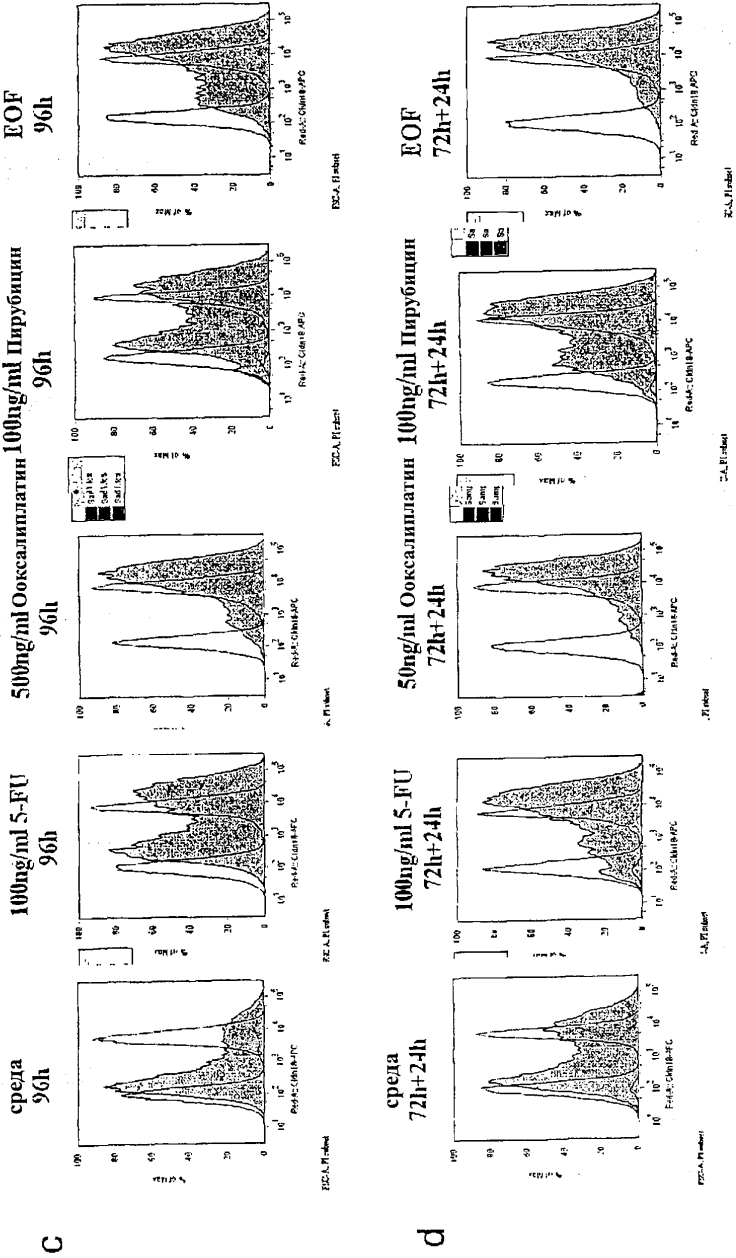
<223> Epitope

<400> 50

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly
1 5 10 15

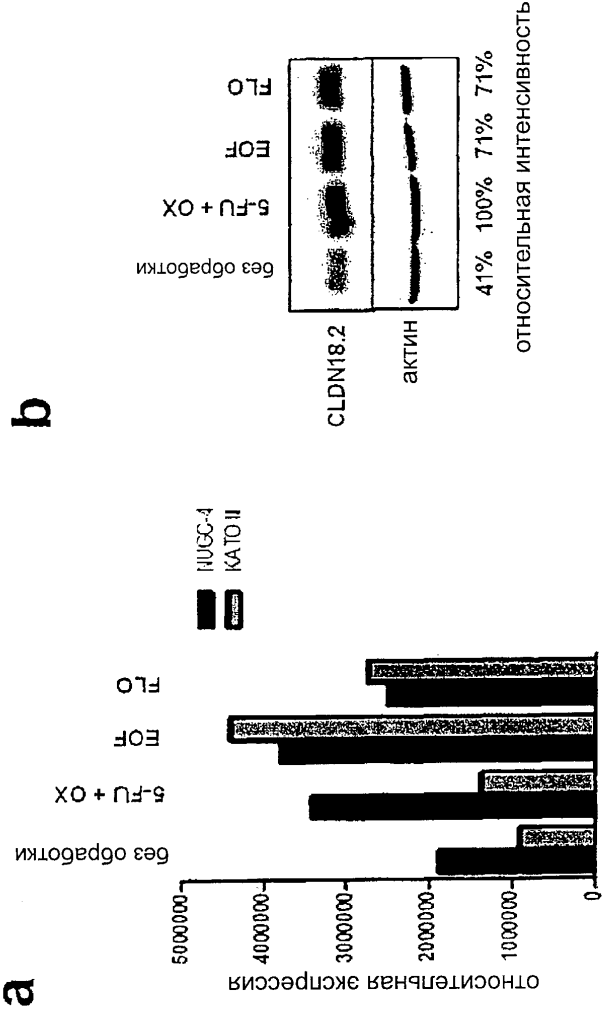


Фиг. 1 (Продолжение)

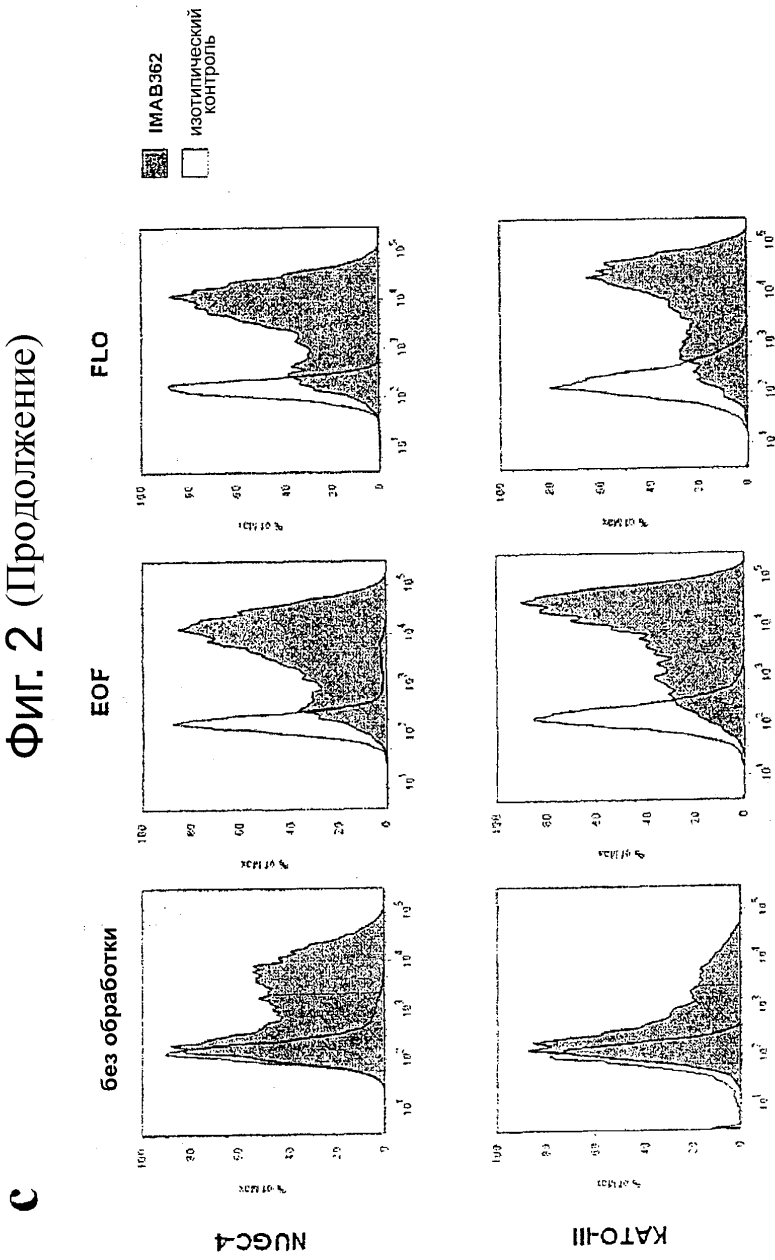


IMAB362
изотипический контроль

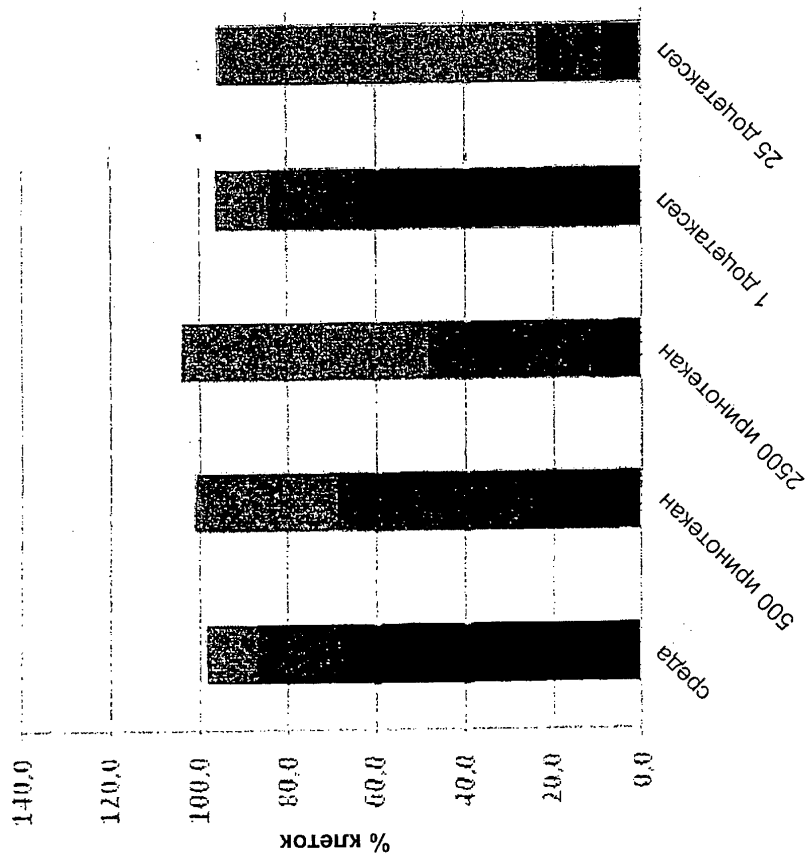
Фиг. 2



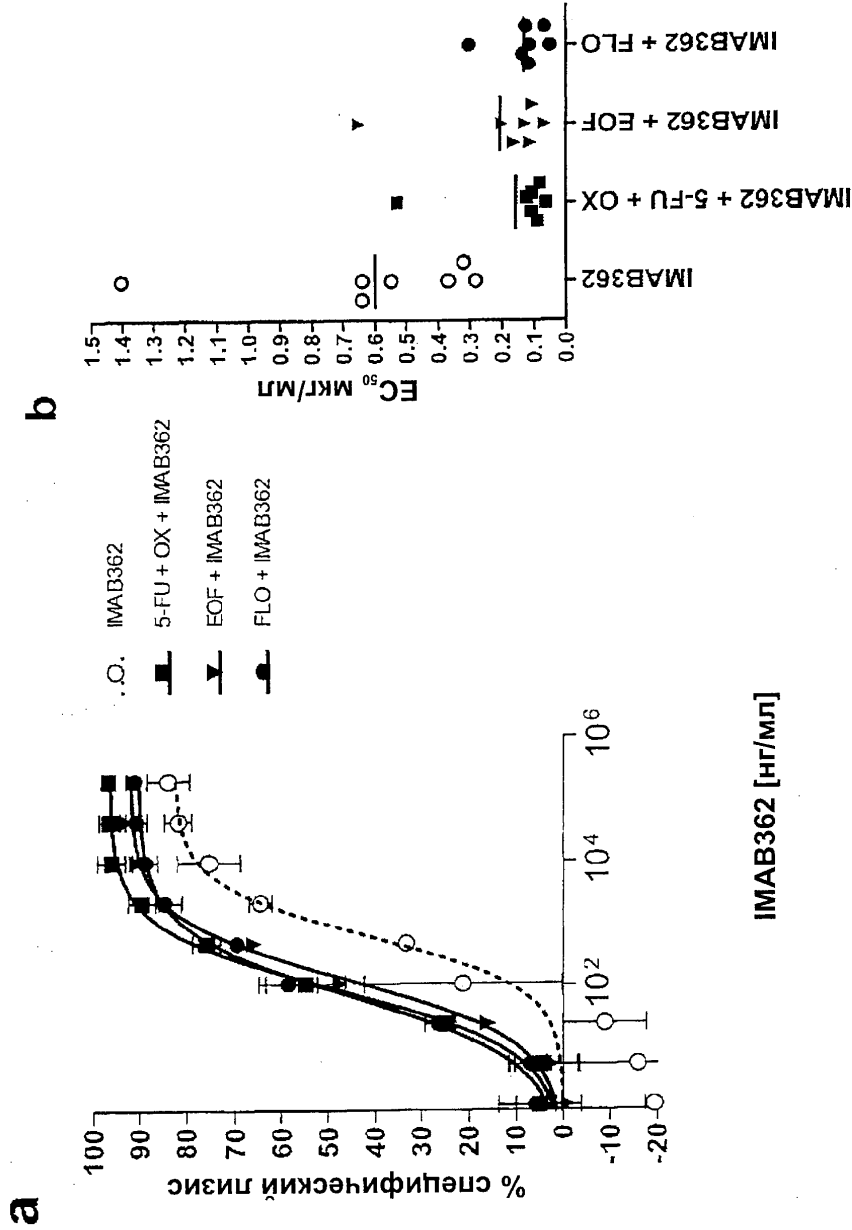
ФИГ. 2 (Продолжение)



Фиг. 3

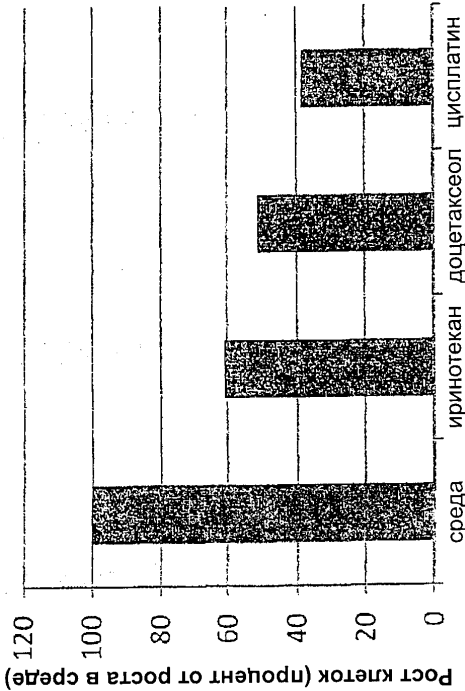


Фиг. 4

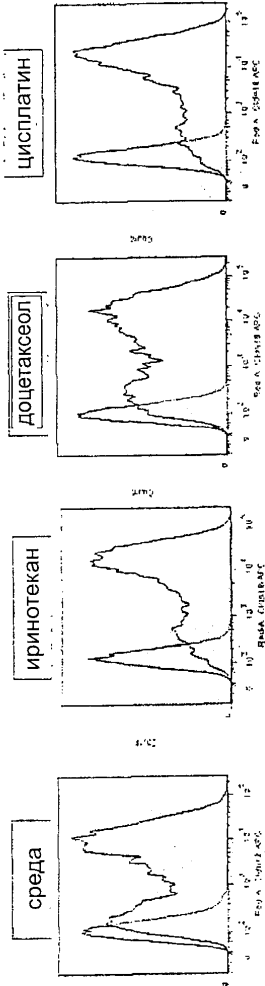


Фиг. 5

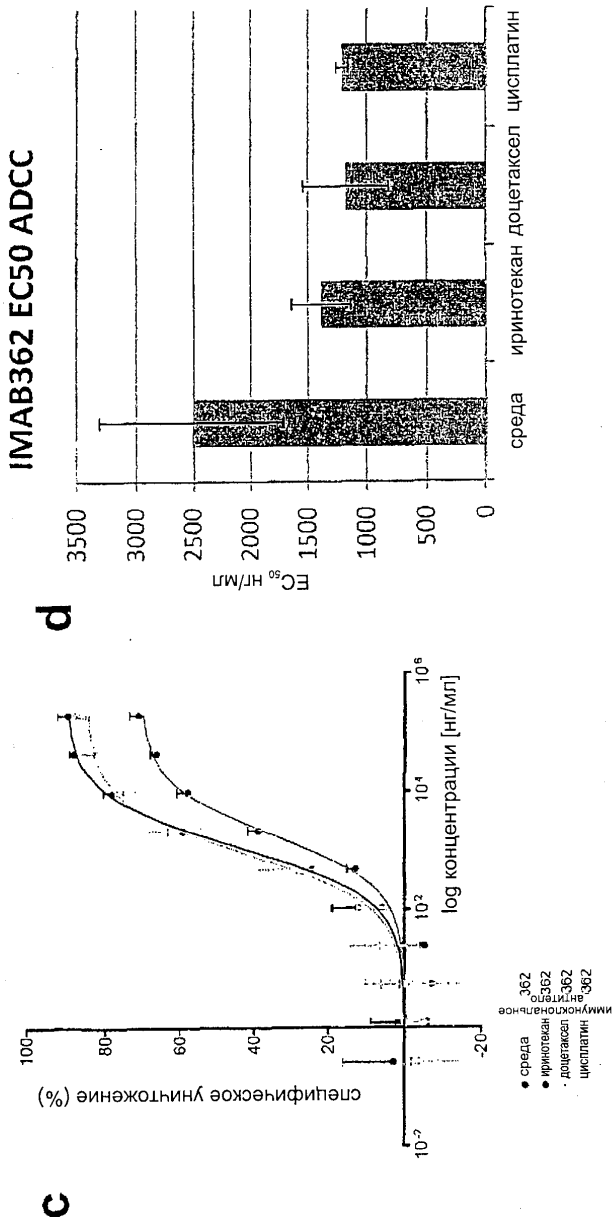
a



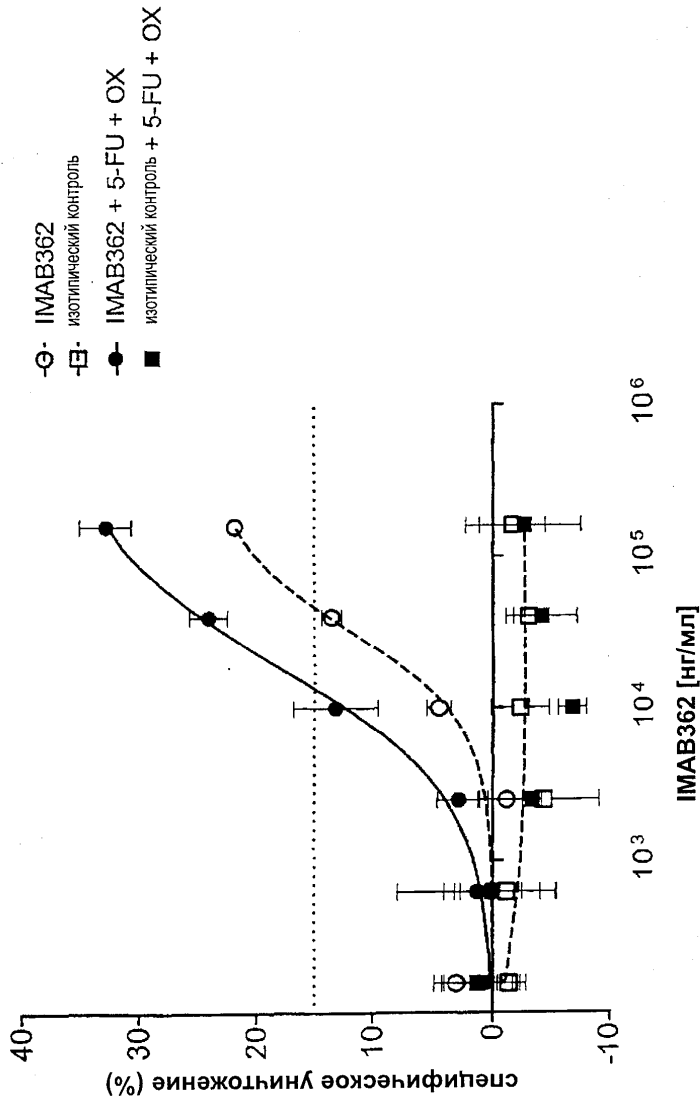
b



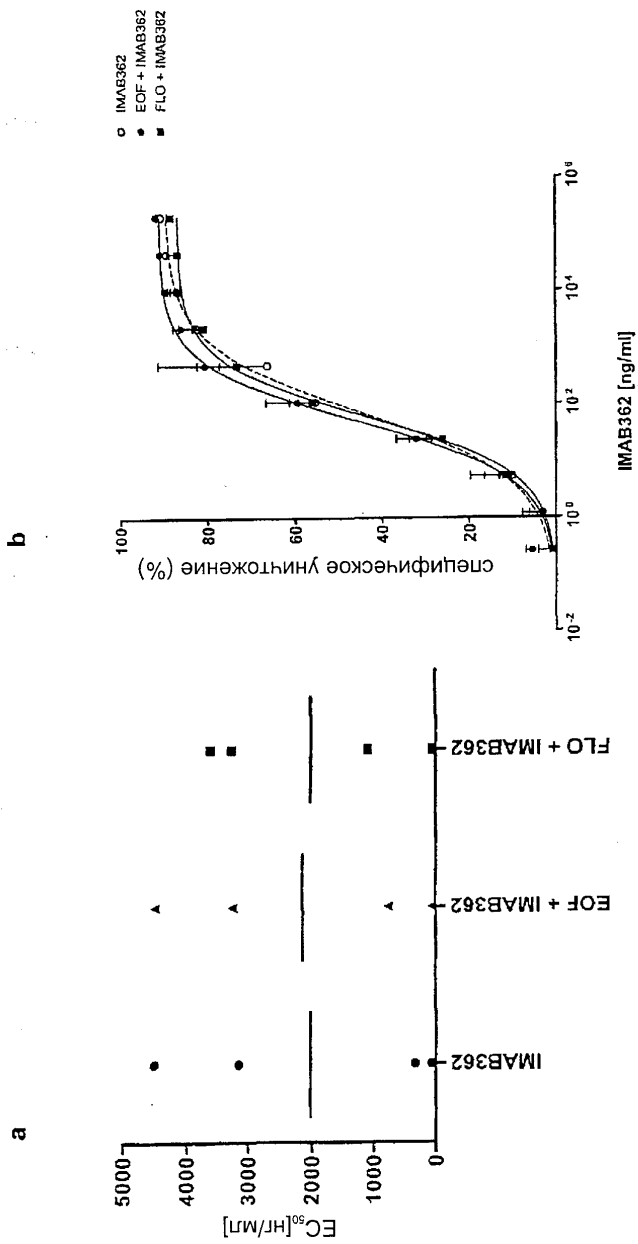
Фиг. 5 (Продолжение)



Фиг. 6

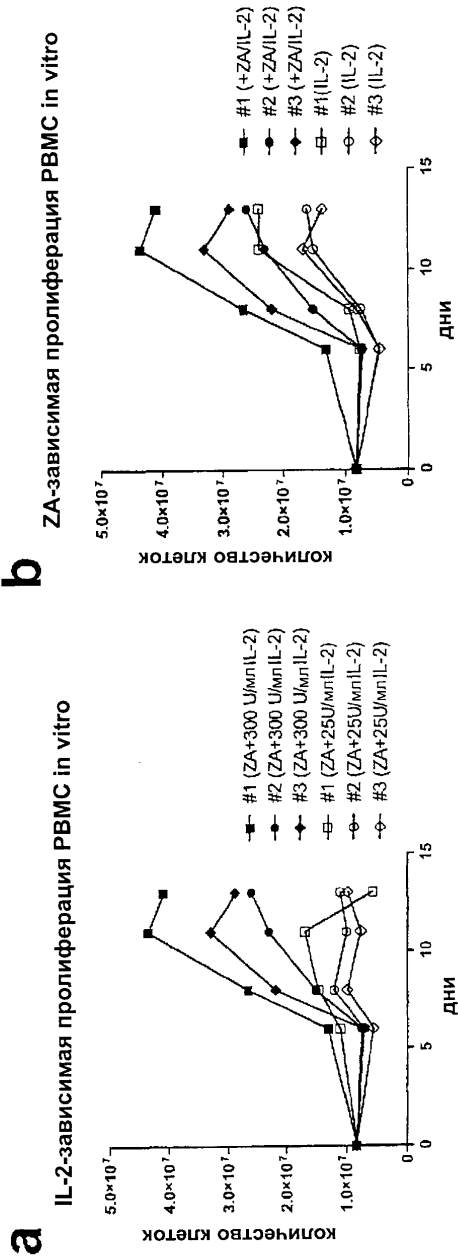


Фиг. 7

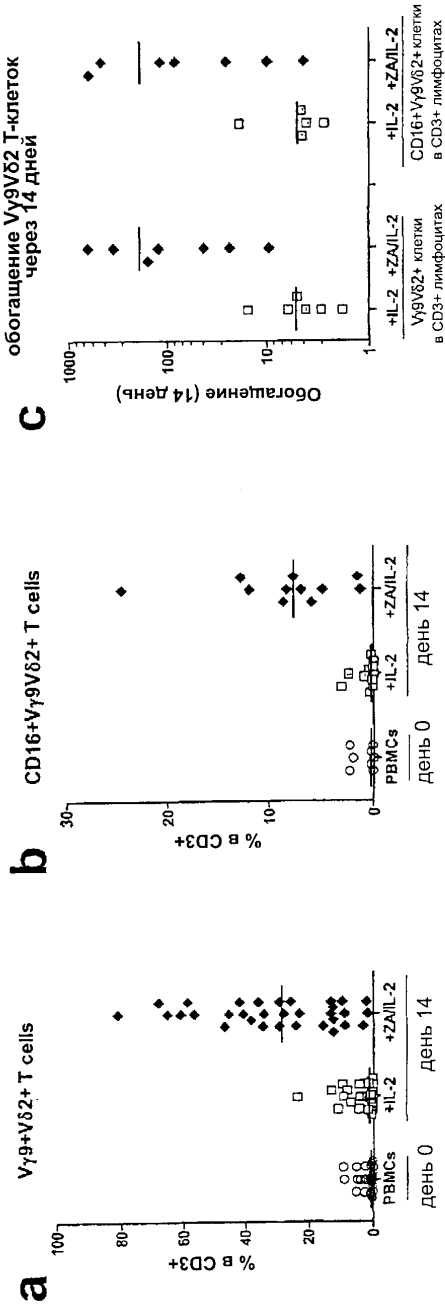


10/29

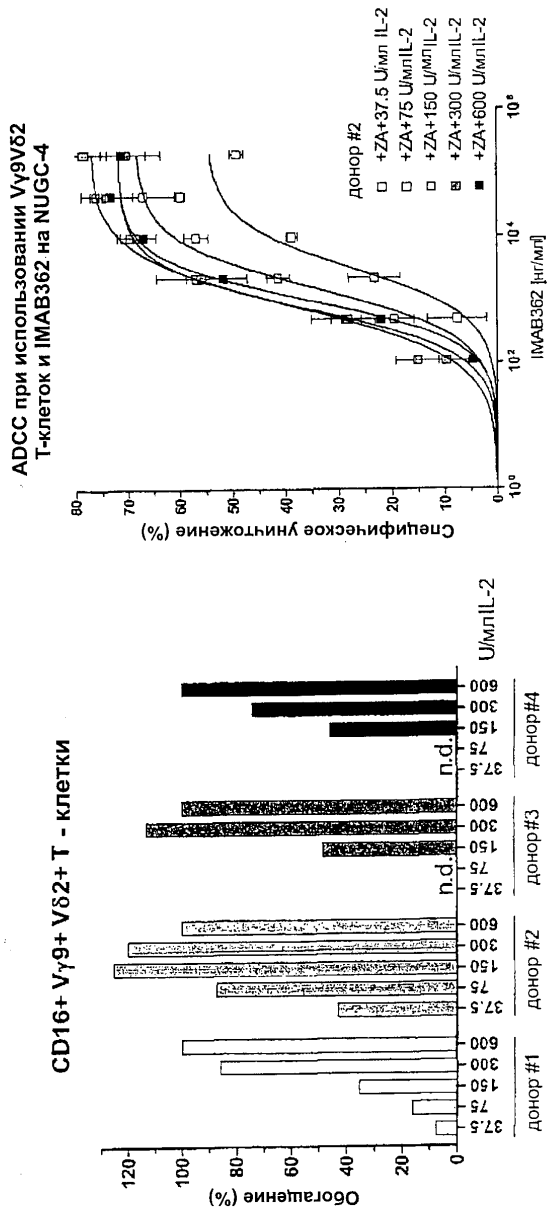
Фиг. 8



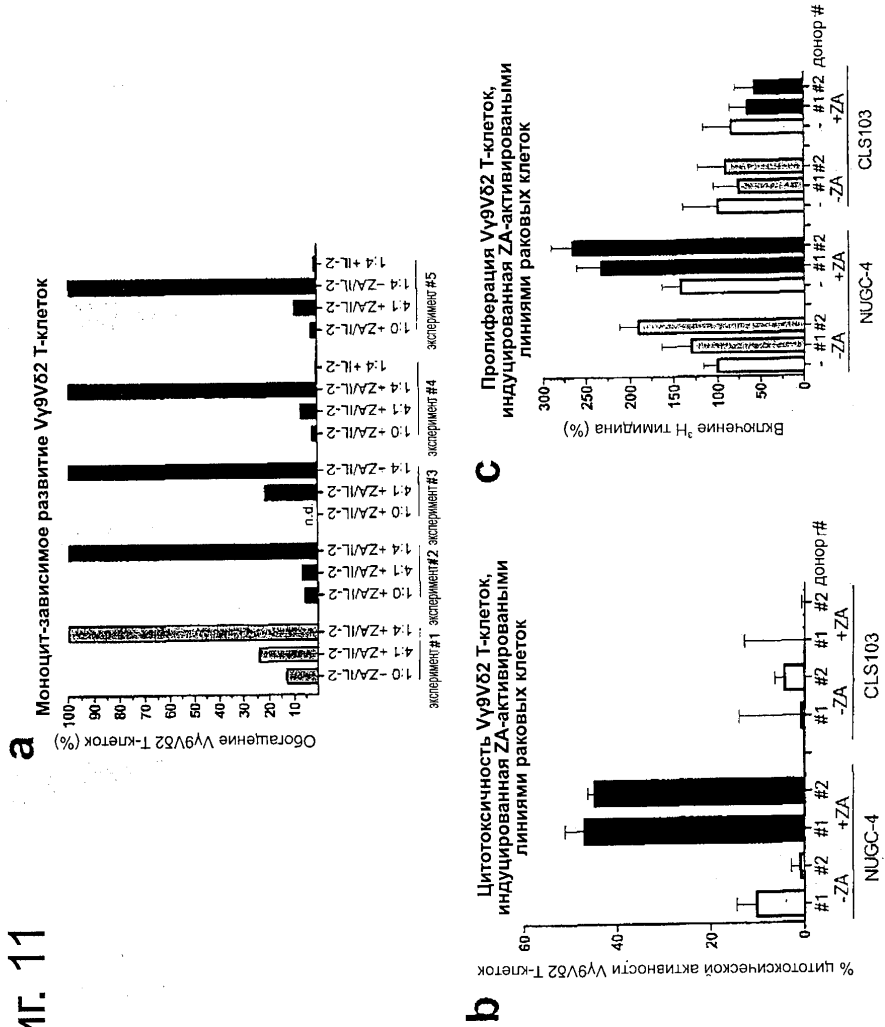
Фиг. 9



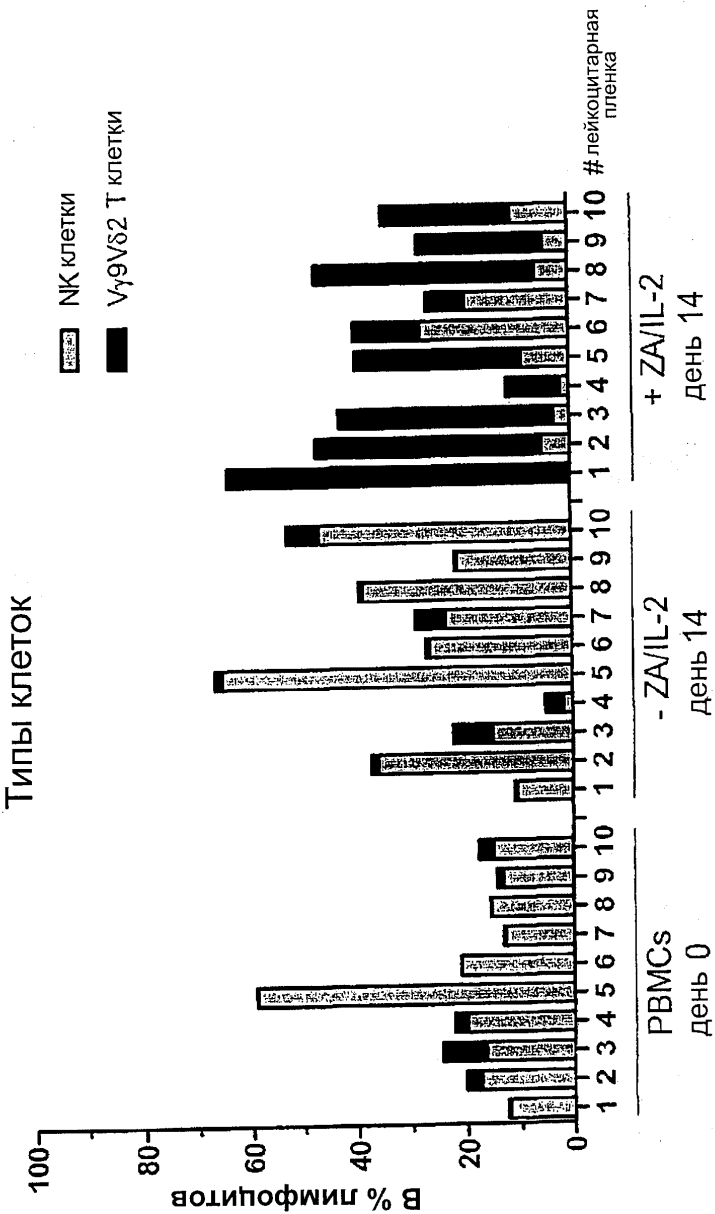
ФИГ. 10



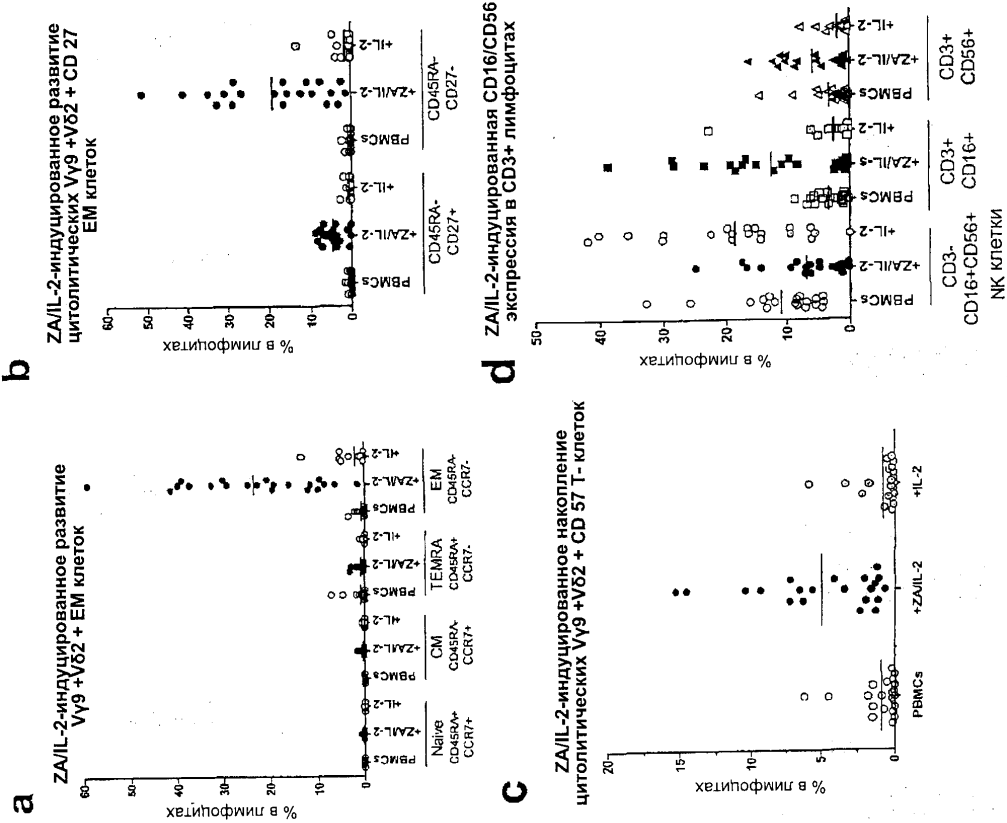
Фиг. 11



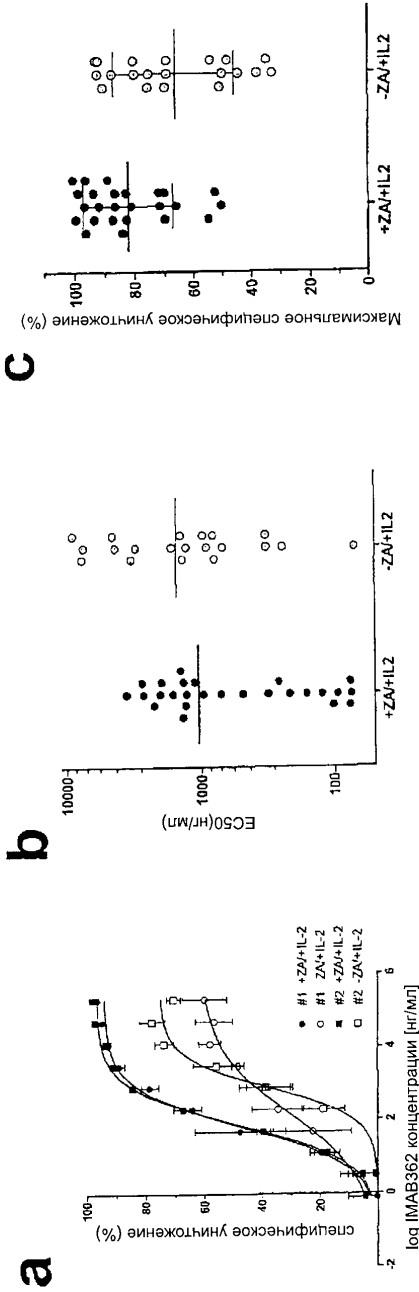
Фиг. 12



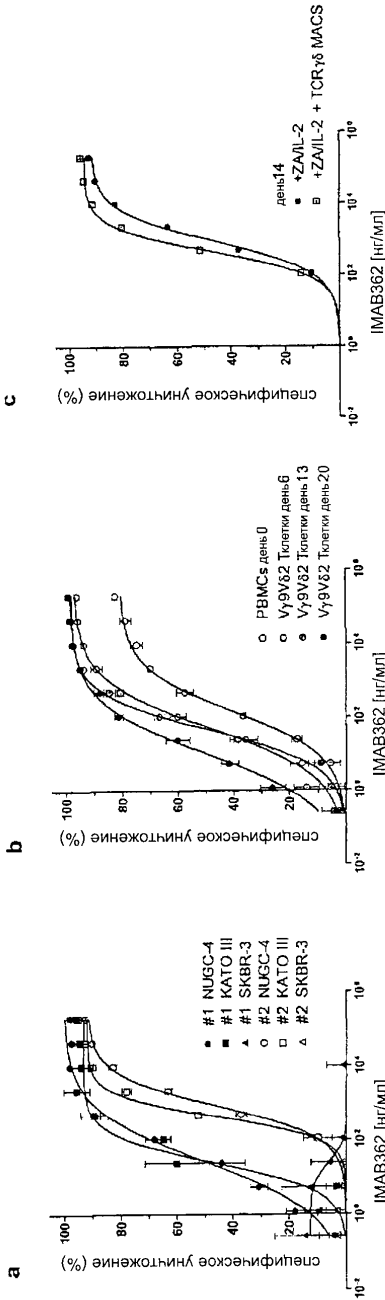
Фиг. 13



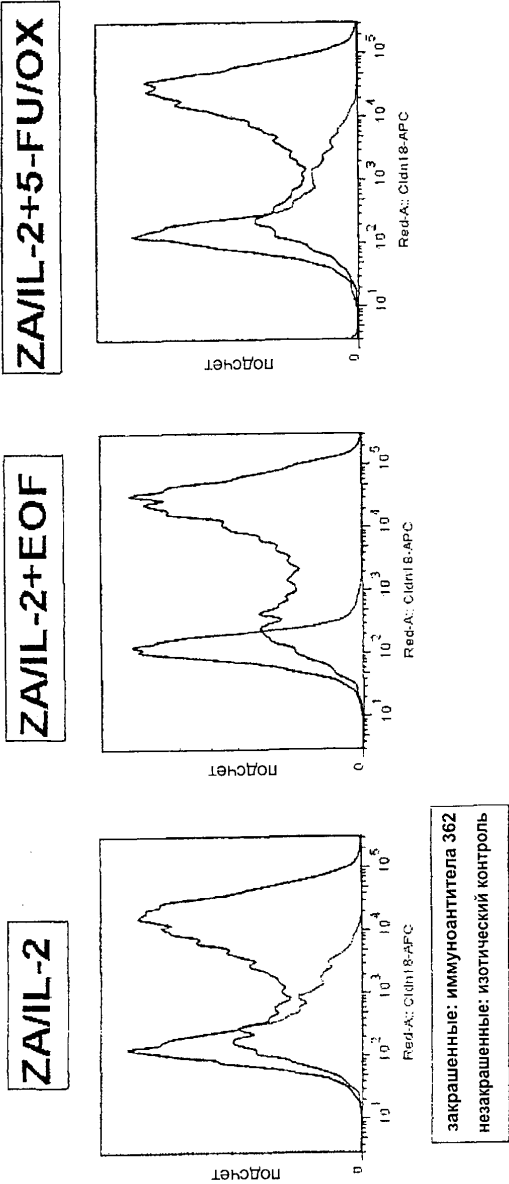
Фиг. 14



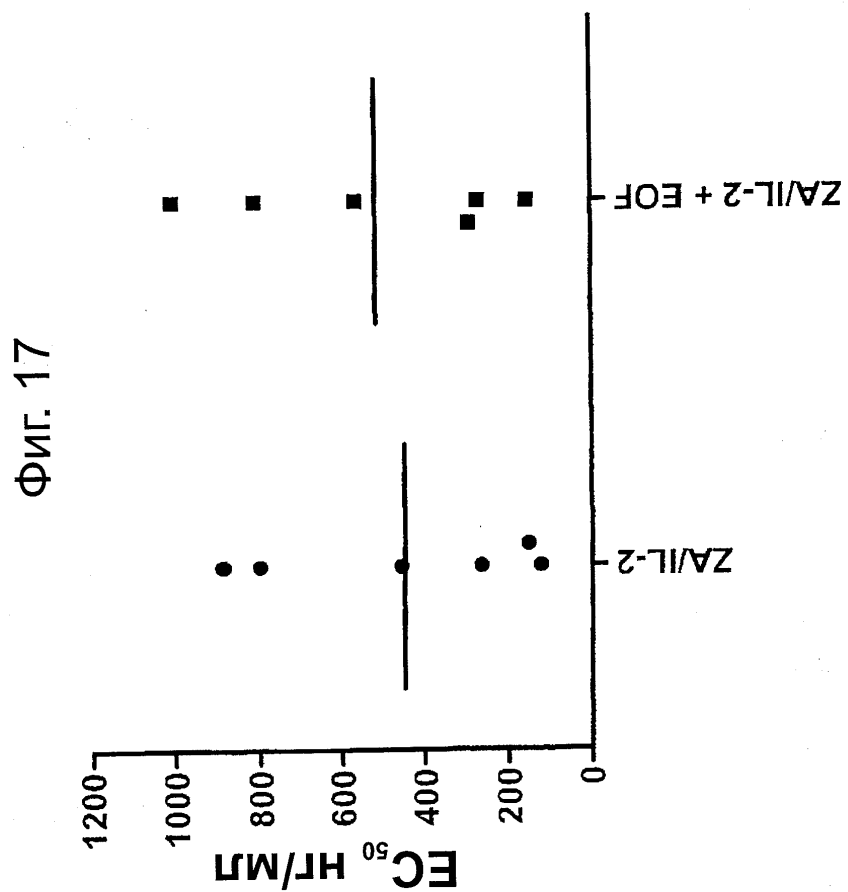
Фиг. 15



Фиг. 16



закрашенные: иммуноантитела 362
незакрашенные: изотический контроль

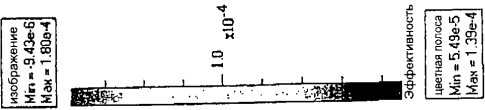
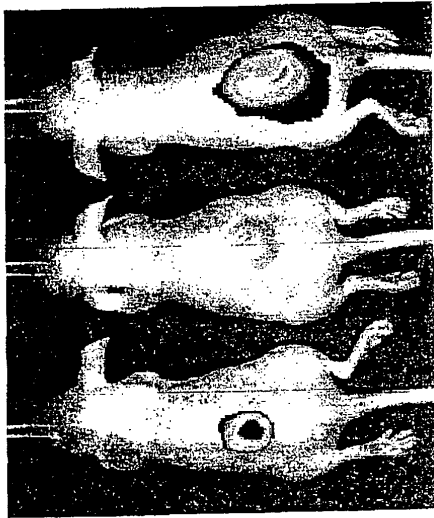


20/29

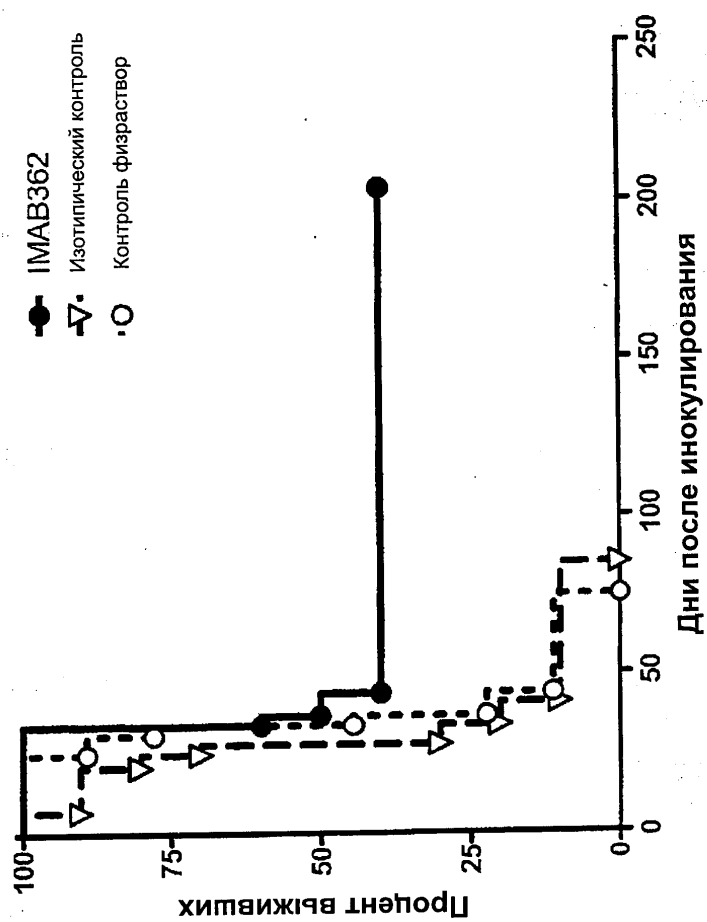
Фиг. 18

24 h

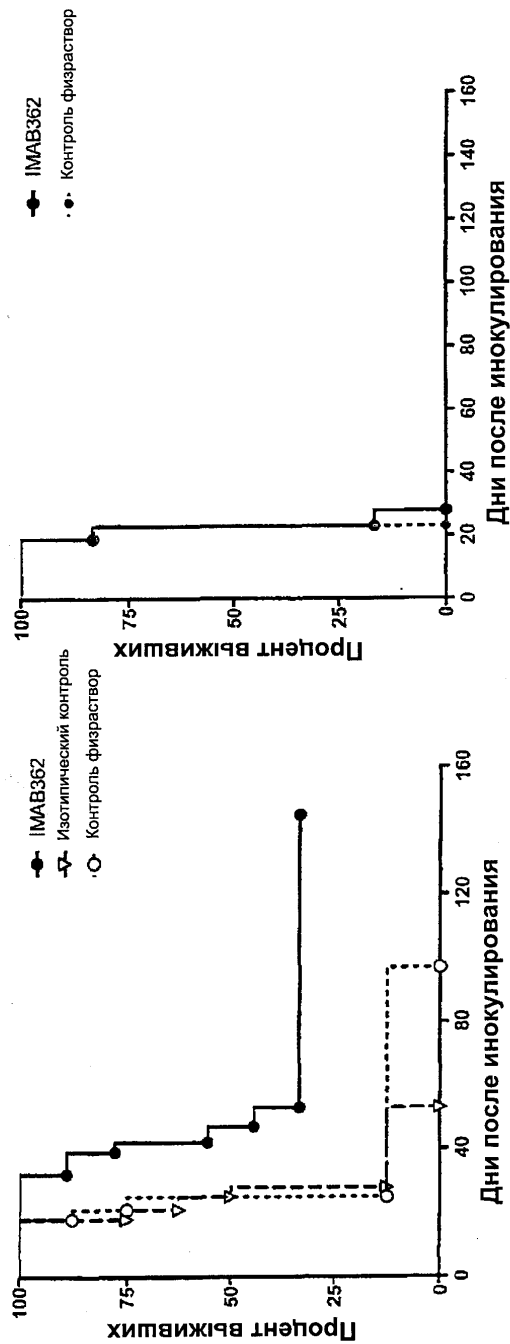
120 h



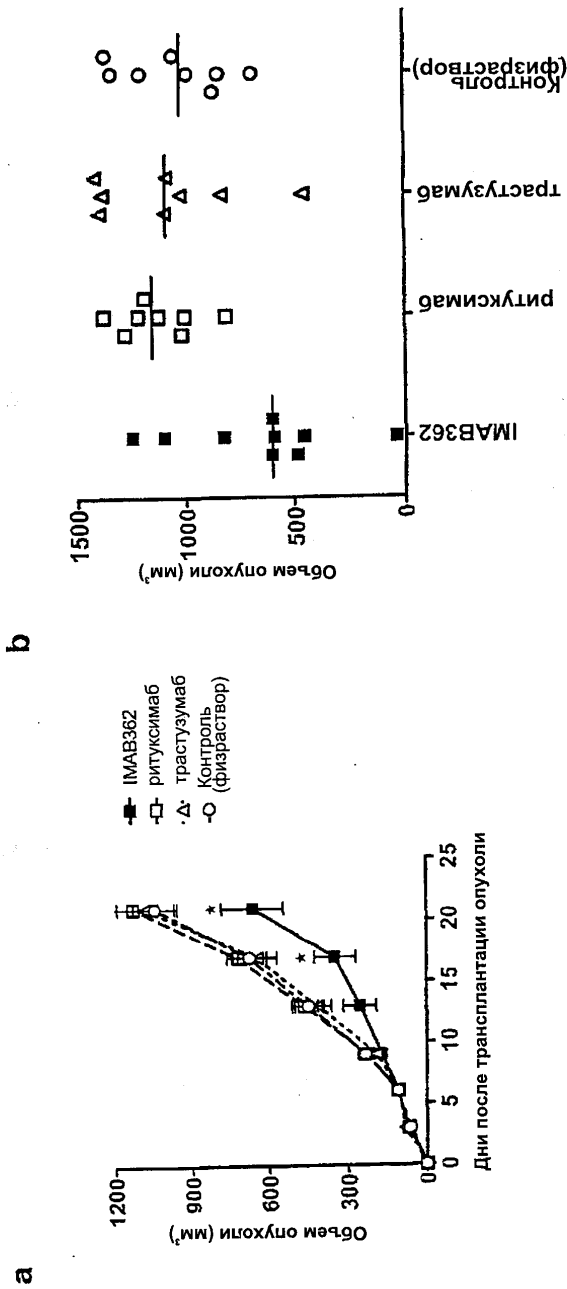
Фиг. 19



Фиг. 20

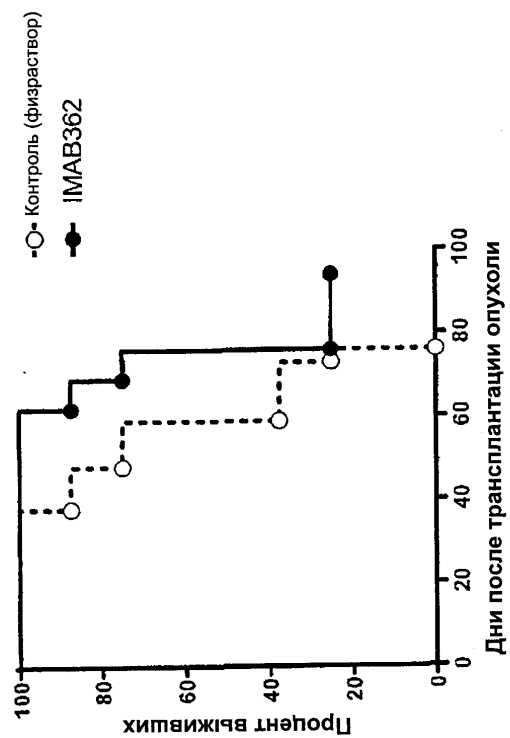


Фиг. 21

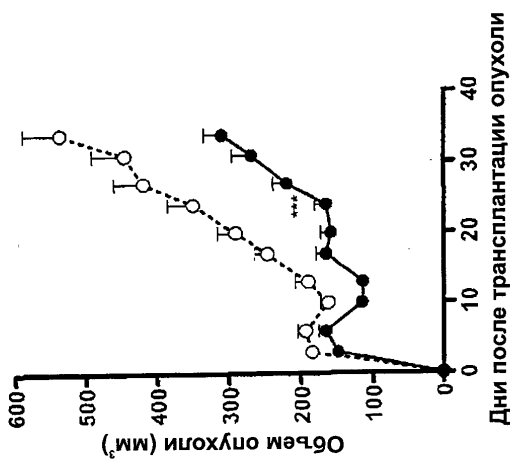


ФИГ. 22

b

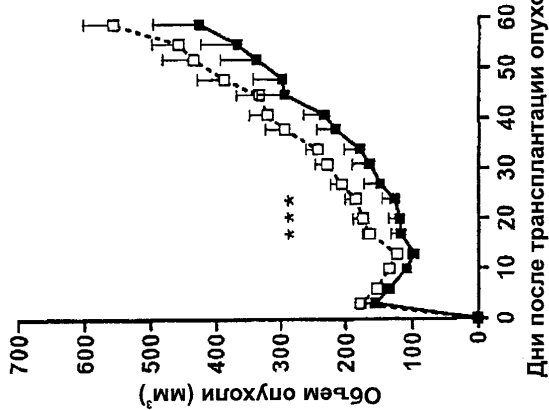


a

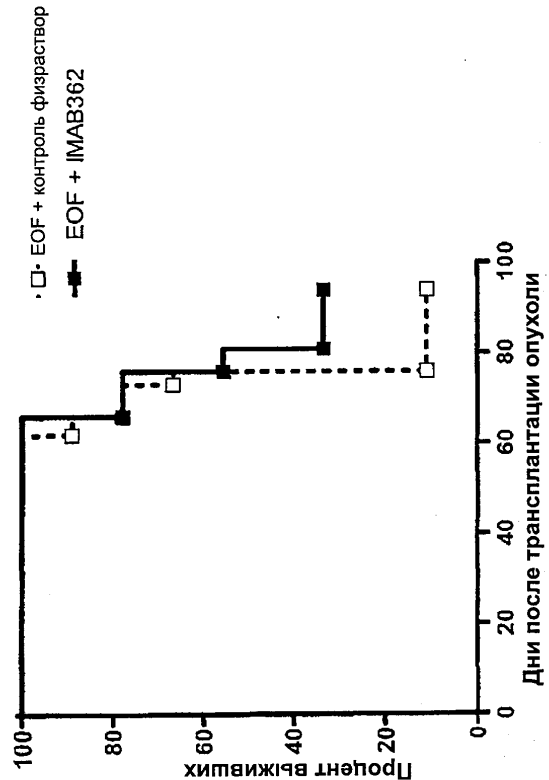


Фиг. 23

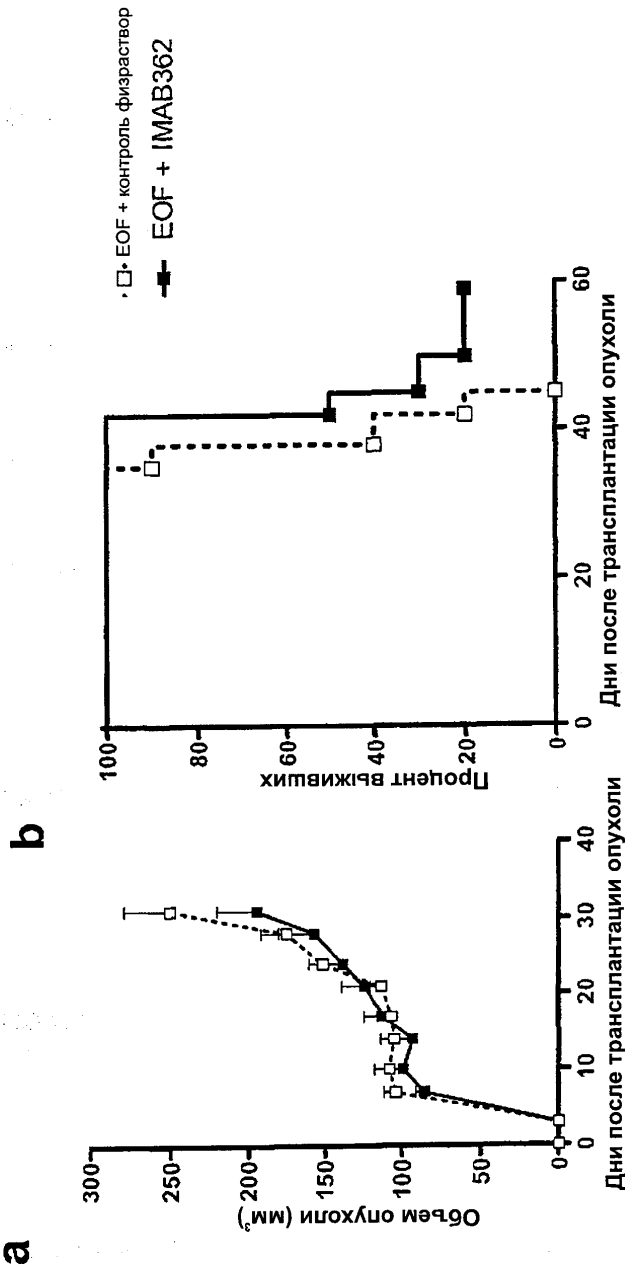
a



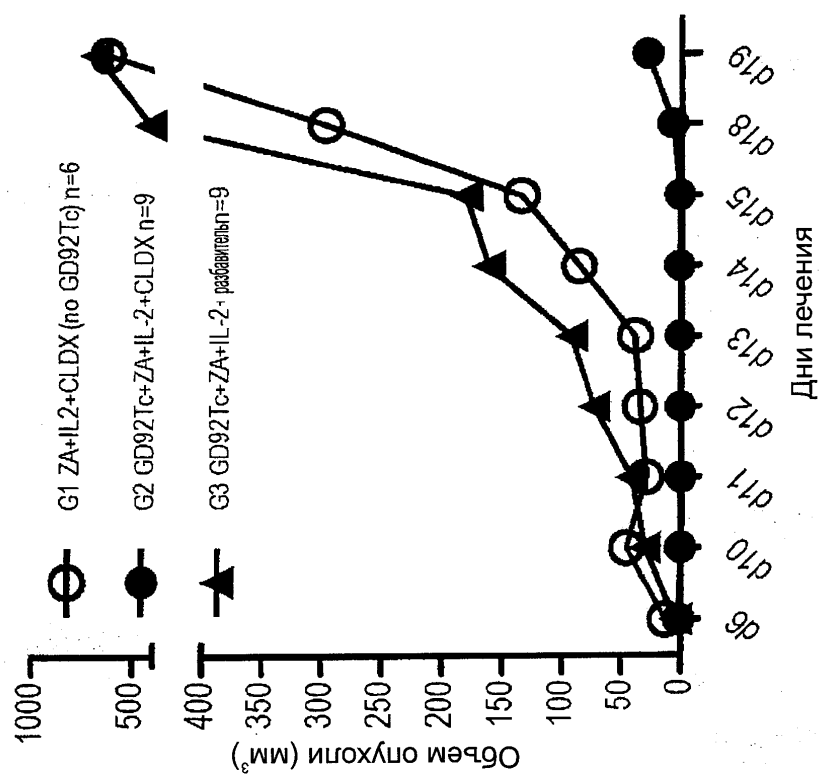
b



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

