

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391243 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.17

(22) Дата подачи заявки
2021.11.26

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/537 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО К CLDN18.2-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011385844.4

(32) 2020.11.30

(33) CN

(86) PCT/CN2021/133376

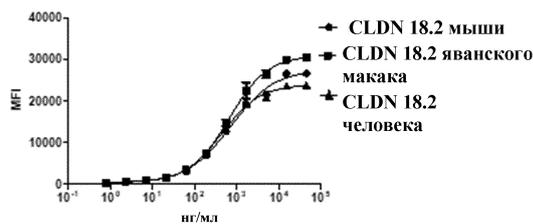
(87) WO 2022/111616 2022.06.02

(71) Заявитель:
СИЭСПИСИ МЕГАЛИТ
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Хуэй Сиу, Сунь Чжаопэн, Цао Вэйжун,
Яо Бин, Лю Бонин, Ху Сисинь, Юань
Цань, Ли Вэньбинь, Ван Яньцуй (CN)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Согласно изобретению предложены антитело к CLDN18.2 (клаудину18.2) и конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный на основе этого антитела. Антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство может эффективно лечить CLDN18.2-положительные опухоли, включая, но не ограничиваясь этим, раковые заболевания, представленные раком желудка и раком поджелудочной железы.



A1

202391243

202391243

A1

| | | | |
|-------------------|-----|-------------------------------|-----------------------------|
| PCT/CN2021/133376 | МПК | <i>A61K 47/68</i> (2017.01) | <i>A61K 45/00</i> (2006.01) |
| | | <i>A61K 31/4745</i> (2006.01) | <i>A61K 45/06</i> (2006.01) |
| | | <i>A61K 31/537</i> (2006.01) | <i>A61P 35/00</i> (2006.01) |
| | | <i>A61K 38/07</i> (2006.01) | <i>C07K 16/28</i> (2006.01) |

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО К CLDN18.2-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

В соответствии с настоящей заявкой испрашивается приоритет согласно заявки на патент Китая № 202011385844.4, поданной 30 ноября 2020 г. и озаглавленной «КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО К CLDN18.2-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ», которая включена сюда посредством ссылки во всей своей полноте для любых целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка в целом касается области биомедицины и более конкретно антител к CLDN18.2, связанных с ними конъюгатов (например, конъюгатов антитело-лекарственное средство) и их применения в лечении или предупреждении опухолей.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Плотные контакты (ТЖ) являются важными функциональными компонентами межклеточной адгезии в эпителии в норме. Они механически соединяют клетки, образуя эпителиальные барьеры, препятствуют транспорту макромолекул между клетками и поддерживают полярность эпителиальных клеток. Белками, составляющими плотные контакты, являются главным образом клаудин (также называемый окклюзионным белком, уплотняющим белком, белком плотных контактов и т.д., и во избежание какой-либо двусмысленности именуемый в настоящей заявке клаудином или сокращенно CLDN), окклюдин, белок Zonula occludens 1 (ZO-1), ZO-2, ZO-3, цингулин (cingulin), Pals1 и MUPP1, среди которых наиболее важными белками являются клаудин и окклюдин.

Клаудин представляет собой основной белок, образующий плотные контакты, и его aberrantная экспрессия может приводить к разрушению структуры и нарушению функции эпителиальных клеток и эндотелиальных клеток и может играть важную роль в патогенезе различных заболеваний. На сегодняшний день обнаружено, что семейство генов клаудина включает 24 члена и что эти члены функционально высоко консервативны в эволюционном плане. Молекулярная масса клаудина составляет 22-27

кДа. Все молекулы клаудина имеют одинаковую структуру. Клаудин широко распространен в нормальных тканях и в разных опухолевых тканях с разной степенью экспрессии. Было обнаружено, что клаудины нескольких типов демонстрировали аномальные профили экспрессии в периоды предраковых поражений раком желудка и при раке желудка, что ассоциируется с прогнозом заболевания.

Ген клаудина18 человека имеет два различных первых экзона и поэтому может образовывать два сплайс-варианта: клаудин18.1 (далее обозначаемый как CLDN18.1) и клаудин18.2 (далее обозначаемый как CLDN18.2). Длина аминокислотных последовательностей CLDN18.1 и 18.2 человека в обоих случаях составляет 261 аминокислотный остаток, и в положениях 0-70 они имеют 21 различных аминокислотных остатков. В случае транскрипционной амплификации этих двух подтипов CLDN18 в различных тканях было обнаружено, что CLDN18.1 избирательно экспрессировался в клетках нормальных легких, тогда как экспрессия CLDN18.2 в нормальных желудках была ограничена дифференцированными короткоживущими эпителиальными клетками желудка.

Научные исследования показали, что хотя CLDN18.1 и CLDN18.2 очень похожи по структуре, картины их экспрессии в опухолях совершенно различны. Например, в случае нормальных тканей CLDN18.1 экспрессируется только в легких, тогда как CLDN18.2 ограничено экспрессируется в желудках. В случае опухолевых тканей сверхэкспрессия CLDN18.1 в легких является незначительной, в то время как при таких видах рака, как рак желудка, рак пищевода и рак поджелудочной железы, наблюдается повышение экспрессии CLDN18.2. При злокачественной трансформации эпителия желудка нарушение клеточной полярности приводит к экспонированию эпитопов CLDN18.2 на поверхности клеток. В то же время ген CLDN18.2 аномально активируется, экспрессируется с высокой степенью избирательности и стабильности в конкретных опухолевых тканях и участвует в пролиферации, дифференцировке и миграции опухолевых клеток, что делает CLDN18.2 эффективной молекулярной мишенью для возможных противоопухолевых лекарственных средств.

Ежегодный коэффициент заболеваемости раком желудка в мире составляет 13,86/100000. У большей части пациентов на момент постановки диагноза имелась запущенная стадия, и их восстановление после хирургического вмешательства считается весьма неудовлетворительным. Кроме того, высок показатель коэффициента заболеваемости у пожилых людей. Общее среднее время выживания составляет менее

одного года, а 5-летняя выживаемость составляет менее 20%.

В настоящее время рак поджелудочной железы также является одной из самых злокачественных опухолей со средним временем выживания менее 6 месяцев и 5-летней общей выживаемостью менее 6%.

Изучение и разработка противоопухолевых лекарственных средств, направленно воздействующих на CLDN18.2, ведется по всему миру. В настоящее время имеется много (около 28) проектов, нацеленных на CLDN18.2, включая моноклональные антитела, биспецифические антитела и Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T), нацеленные на CLDN18.2. Среди всех этих проектов наиболее разработанным является моноклональное антитело клаудиксимаб (сейчас под названием золбетуксимаб) от компании Ganymed, Inc. (входящей в состав Astellas). Его клинические испытания по показанию рака желудка вступили в фазу III. В общей сложности 9 проектов перешли в клинические фазы, а большинство других проектов находятся на доклинических фазах. В отношении терапевтических эффектов имелась значительная неопределенность. Как следует из текущих данных, какие-либо сообщения в отношении клинических исследований конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) с направленным воздействием на CLDN18.2 отсутствуют.

CLDN18.2 представляет собой превосходную мишень для лечения раковых заболеваний пищеварительного тракта и раковых заболеваний поджелудочной железы. Тем не менее, поскольку CLDN18.1 отличается от CLDN18.2 на 7 аминокислотных остатков во внеклеточном домене ECD1, состоящем примерно из 50 аминокислот, то задача конструирования антитела, специфично распознающего CLDN18.2, а не CLDN18.1, является проблемой при разработке лекарственных средств на основе моноклональных антител, направленно воздействующих на CLDN18.2.

Кроме того, хотя терапевтические методы с использованием моноклональных антител обычно обладают такими характеристиками, как высоконаправленная специфичность и низкий уровень побочных эффектов, эффективность самого моноклонального антитела имеет ограничения. Поэтому большинство моноклональных антител используют в сочетании с химиотерапевтическими агентами. В настоящее время основной подход к повышению эффективности моноклональных антител заключается в применении конъюгатов антитело-лекарственное средство. Конъюгаты антитело-лекарственное средство принадлежат к новому классу противораковых биологических «ракетных лекарственных средств» (missile drug), состоящих по существу из трех

компонентов, а именно антител, молекул лекарственного средства и линкеров, соединяющих антитела с молекулами лекарственного средства. После конъюгирования моноклональных антител с молекулами лекарственного средства путем химического связывания конъюгаты антитело-лекарственное средство специфически распознают рецептор, на который нацелено антитело, на поверхности раковой клетки благодаря имеющейся у моноклонального антитела способности к направленному воздействию, связываются с рецептором, проникают в клетку, высвобождают молекулы лекарственного средства посредством расщепления внутриклеточными протеазами и, таким образом, предотвращают размножение раковой клетки и уничтожают раковую клетку. Метод связывания антитела и лекарственного средства позволяет объединить низкомолекулярные лекарственные средства с биологически активными белками, что позволяет использовать их преимущества, повышает эффективность лекарственных средств и снижает токсические и побочные эффекты. ADC становятся терапевтическими продуктами нового поколения.

По состоянию на сентябрь 2020 г. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило выход на рынок в общей сложности 9 лекарственных средств в форме ADC, включая адцетрис от Seattle, препараты кадсила и поливи от Genentech, препараты беспонса и милотарг от Wyeth, препараты люмоксити и энхерту от AstraZeneca и троделви от Immunomedics. Ни одно лекарственное средство в форме ADC, разработанное в Китае, не поступало на рынок.

Как лекарственные средства на основе антител, так и конъюгаты антитело-лекарственное средство, являются перспективными типами лекарственных средств. Область медицины крайне нуждается в более комплексных исследованиях и разработках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту в настоящей заявке предложен конъюгат, содержащий антитело к CLDN18.2 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела в соответствии с настоящей заявкой, конъюгированное(ый) с одной или несколькими молекулами лекарственного средства.

Согласно второму аспекту в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по первому аспекту и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно третьему аспекту в настоящей заявке предложено применение конъюгата по первому аспекту или фармацевтической композиции по второму аспекту

для изготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения рака.

Согласно четвертому аспекту в настоящей заявке предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества конъюгата по первому аспекту или фармацевтической композиции по второму аспекту.

Согласно пятому аспекту в настоящей заявке предложен медицинский препарат (например, набор), содержащий конъюгат по первому аспекту или фармацевтическую композицию по второму аспекту.

Согласно шестому аспекту в настоящей заявке предложено применение конъюгата по первому аспекту и антипролиферативного агента для изготовления лекарственного средства для лечения опухоли.

Согласно седьмому аспекту в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по первому аспекту и антипролиферативный агент.

Согласно восьмому аспекту в настоящей заявке предложен способ лечения опухоли у субъекта, включающий введение указанному субъекту, страдающему от опухоли, терапевтически эффективного количества конъюгата по первому аспекту или фармацевтической композиции по второму аспекту и антипролиферативного агента.

Согласно девятому аспекту в настоящей заявке предложены антитело к CLDN18.2 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело или указанный антигенсвязывающий фрагмент, применение указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента для изготовления лекарственного средства и способ применения указанного антитела или антигенсвязывающего фрагмента для лечения опухоли/рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 показано схематическое изображение структуры клаудина.

На ФИГ. 2 показано схематическое изображение структуры ADC на основе SYJS001, на котором L&D означает линкер (линкер, «L») плюс молекула лекарственного средства (лекарственное средство, «D»), с правой стороны L&D показывает полную структуру, а обведенная кружком часть означает, что линкер в L&D присоединяется к антителу через амидные связи. ADC на основе SYJS001, продемонстрированный в настоящей заявке, представляет собой конъюгат сайтспецифическое антитело-лекарственное средство, при этом каждая молекула состоит из полностью человеческого моноклонального антитела к CLDN18.2 (mAb SYJS001), соединенного с молекулой

производного MMAE (монометилауристатина E) посредством линкера ($\text{NH}_2\text{-PEG}_3\text{-Val-Cit}$, где Cit означает цитруллин, а PEG означает полиэтиленгликоль (ПЭГ)) по аминокислотному остатку Q298 (т.е. с номером согласно Kabat Q295) в каждой тяжелой цепи. Антитело и линкер соединены посредством стабильной амидной связи (изопептидной связи). Среднее значение соотношения лекарственного средства и антитела (DAR) составляет 2,0, а относительная молекулярная масса составляет 150 кДа.

На ФИГ. 3 показана карта плазмиды pGenHT1.0-DGV.

На ФИГ. 4 показана карта двойного расщепления ферментами для SYJS001 в плазмиде pGenHT1.0-DGV. Дорожка M соответствует лэддеру в т.п.о. (kb ladder); дорожка 1 соответствует суперспиральному состоянию; дорожка 2 соответствует линейризованной плазмиде, образованной в результате расщепления эндонуклеазой PvuI; дорожка 3 соответствует тяжелой цепи, легкой цепи и оставшимся фрагментам, образованным в результате расщепления под действием AscI/PmlI.

На ФИГ. 5 показано схематическое изображение гена SYJS001 в плазмиде pGenHT1.0-DGV.

На ФИГ. 6 показаны спектральные данные для определения степени модификации ADC на основе SYJS001, где пики в моменты времени 4,89 и 95,11 относятся к моноклональному антителу к CLDN18.2 и конъюгату моноклональное антитело к CLDN18.2-лекарственное средство, соответственно.

На ФИГ. 7 показаны спектральные данные для определения распределения DAR для ADC на основе SYJS001.

На ФИГ. 8 показаны кривые связывания ADC на основе SYJS001 с клетками, экспрессирующими CLDN18.2 человека, мыши и обезьяны.

На ФИГ. 9 показаны результаты эксперимента по перекрестной реактивности в отношении антитела SYJS001.

На ФИГ. 10 показаны результаты анализа специфического связывания ADC на основе SYJS001 с CLDN18.2.

На ФИГ. 11 показана картина эндоцитоз ADC на основе SYJS001 клетками HEK293-CLDN18.2.

На ФИГ. 12 показан эффект ингибирования роста клеток NCI-N87-CLDN18.2 *in vitro* под действием «голового» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоное» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 13 показан эффект ингибирования роста клеток КАТОIII *in vitro* под действием «голоого» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоое» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 14 показан эффект ингибирования роста клеток NCI-H460-CLDN18.2 *in vitro* под действием «голоого» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоое» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 15 показан эффект ингибирования роста клеток NUGC4-CLDN18.2 *in vitro* под действием «голоого» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоое» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 16 показан эффект ингибирования роста клеток PATU8988S *in vitro* под действием «голоого» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоое» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 17 показан эффект ингибирования роста клеток ВхРС-3-CLDN18.2 *in vitro* под действием «голоого» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001, где группа 1 обозначает ADC на основе SYJS001 (точки квадратной формы), а группа 2 обозначает «голоое» антитело SYJS001 (точки круглой формы).

На ФИГ. 18 показан противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении клеток ВхРС-3-CLDN18.2 под действием ADC на основе SYJS001 в сравнении с гемцитабином.

На ФИГ. 19 показан противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении клеток NUGC4-CLDN18.2 под действием ADC на основе SYJS001 в сравнении с цисплатином.

На ФИГ. 20 показан противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении клеток ВхРС-3-CLDN18.2 под действием ADC на основе SYJS001 в сравнении с IMAB362-ADC.

На ФИГ. 21 показан противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении клеток NUGC4-CLDN18.2 под действием ADC на основе SYJS001 в сравнении с IMAB362-ADC.

На ФИГ. 22 показаны результаты экспериментов по высвобождению MMAE в сравнении с эффектом «свидетеля».

На ФИГ. 23 показаны результаты эксперимента по сравнению аффинностей у SYJS001 и IMAB362.

На ФИГ. 24 показаны результаты эксперимента по сравнению степени эндоцитоза в отношении SYJS001 и IMAB362.

На ФИГ. 25 показаны результаты ингибирования роста клеток *in vitro* под действием ADC на основе SYJS001 и ADC на основе IMAB362 (на клеточной модели аденокарциномы).

На ФИГ. 26 показаны результаты ингибирования клеток *in vitro* под действием ADC на основе SYJS001 и ADC на основе IMAB362 (на клеточной модели рака желудка).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Если не указано иное, все научные и технические термины, использованные в данном описании, имеют такое же значение, которое понимается специалистом средней квалификации в данной области техники. Для определений и терминов, применяемых в данной области техники, специалист в данной области может обратиться непосредственно к сборнику Современные протоколы в молекулярной биологии (Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel). Сокращениями для аминокислотных остатков являются стандартные 3-буквенные и/или 1-буквенные коды, используемые в данной области техники для обозначения каждой из 20 общеизвестных L-аминокислот.

Хотя численные диапазоны и приближения параметров показаны в настоящей заявке в широких диапазонах, численные значения, приведенные в конкретных воплощениях, описаны как можно более точно. Однако, любые численные значения в своей основе содержат некоторые ошибки вследствие стандартного отклонения, имеющегося при их соответствующих измерениях. Кроме того, следует понимать, что все диапазоны, приведенные в данном описании, охватывают все возможные поддиапазоны, содержащиеся в них. Например, следует считать, что диапазон «от 1 до 10» охватывает все возможные поддиапазоны от минимального значения 1 до максимального значения 10, включительно, т.е. все поддиапазоны, начинающиеся от минимального значения 1 или выше, как например, от 1 до 6,1, и поддиапазоны, оканчивающиеся максимальным значением 10 или ниже, как например, от 5,5 до 10. Кроме того, любую ссылку, упоминаемую как «включенную в данное описание», следует понимать как включенную во всей своей полноте.

Использованные в данном описании термины «фармацевтическая композиция», «комбинированное лекарственное средство» и «фармацевтическая комбинация» можно использовать взаимозаменяемо для обозначения комбинации по меньшей мере одного

лекарственного средства и, возможно, фармацевтически приемлемого носителя или адьюванта, которые объединяют вместе для достижения конкретной цели. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция включает комбинацию, разделенную во времени и/или пространстве, при условии, что ее компоненты способны действовать вместе для достижения цели настоящей заявки. Например, содержащиеся в фармацевтической композиции ингредиенты (например, антитела, молекулы нуклеиновых кислот, комбинации молекул нуклеиновых кислот и/или конъюгаты в соответствии с настоящей заявкой) можно вводить субъекту вместе или по отдельности. Если ингредиенты, содержащиеся в фармацевтической композиции, вводят субъекту по отдельности, то эти ингредиенты можно вводить субъекту одновременно или последовательно. Предпочтительно, фармацевтически приемлемым носителем является вода, забуференный водный раствор, изотонический солевой раствор, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) (фосфатный буфер), глюкоза, маннит, декстроза, лактоза, крахмал, стеарат магния, целлюлоза, карбонат магния, 0,3%-ный раствор глицерина, гиалуроновая кислота, этанол или полиалкиленгликоли, такие как полипропиленгликоль, или триглицериды. Тип фармацевтически приемлемого носителя зависит, помимо прочего, от того, готовят ли композицию в соответствии с настоящей заявкой для перорального, назального, интрадермального, подкожного, внутримышечного или внутривенного введения. Композиции в соответствии с настоящей заявкой могут содержать увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты или буферные вещества в качестве вспомогательных веществ.

Фармацевтические композиции, вакцины или фармацевтические композиции в соответствии с настоящей заявкой можно вводить любым подходящим путем, например перорально, назально, интрадермально, подкожно, внутримышечно или внутривенно.

Использованный в данном описании термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к дозе, достаточной для оказания благоприятного воздействия на субъекта, которому ее вводят. Фактически вводимая доза, скорость и курс введения будут зависеть от тяжести состояния и заболевания у подвергаемого лечению субъекта. Терапевтическое назначение (например, назначаемая доза) в конечном счете составляет ответственность и зависит от врача общей практики или других врачей и, как правило, учитывает подвергаемое лечению заболевание, состояние отдельного пациента, место доставки, способ введения и другие известные врачу факторы.

Использованный в данном описании термин «субъект» относится к млекопитающему, такому как человек, а также другим животным, таким как дикие животные (например, цапли, аисты или журавли), домашние животные (например, утки или гуси) или экспериментальные животные (например, гориллы, обезьяны, крысы, мыши, кролики, морские свинки, сурки или суслики).

Термин «антитело», в своем широком смысле, охватывает интактные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты («антигенсвязывающие группировки») или их одноцепочечные варианты. «Полноразмерное/интактное антитело» относится к белку, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи, содержащую три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи, содержащую один домен CL. Области VH и VL можно далее подразделить на несколько участков с высокой вариабельностью, называемых определяющими комплементарность участками (CDR). Между CDR имеются консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH или VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Эти переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающие домены, которые взаимодействуют с антигенами. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом классической системы комплемента (C1q). Химерные или гуманизированные антитела также считаются антителами в соответствии с настоящей заявкой. Полноразмерное/интактное антитело может быть представлено антителами любого типа, такими как антитела IgD, IgE, IgG, IgA или IgM классов (или подклассов указанных выше классов), но не принадлежащими к какому-либо конкретному классу. Иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам в зависимости от аминокислотных последовательностей константного домена тяжелой цепи антител. Как правило, иммуноглобулины бывают пяти основных классов, т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из этих классов можно далее подразделить на подклассы (изотипы), такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , β , δ , ϵ , γ и μ ,

соответственно. Субъединичные структуры и пространственные структуры иммуноглобулинов различных классов хорошо известны.

Определяющие комплементарность участки (CDR, обычно включающие CDR1, CDR2 и CDR3) представляют собой подобласти в переменных областях, которые оказывают самое большое влияние на аффинность и специфичность антитела. Последовательности CDR в VH или VL можно определить несколькими общеизвестными путями, включая использование базы данных по иммуногенетике (IMGT), определение согласно Chothia и определение согласно Kabat. В случае последовательности переменной области заданного антитела последовательности CDR в последовательностях VH и VL можно определить согласно IMGT, применяя определение согласно Chothia или определение согласно Kabat.

Термин «гуманизованное антитело» относится к антителу, которое может содержать участки CDR, происходящие из человеческого антитела, и остальные части, происходящие из одного (или нескольких) человеческих антител. Более того, чтобы сохранить аффинность связывания, некоторые остатки сегментов остова (называемых FR) могут быть модифицированы. Гуманизованные антитела или их фрагменты, соответствующие настоящей заявке, могут быть получены методами, известными специалистам в данной области техники.

Термин «полугуманизованное антитело» определяется во взаимосвязи с гуманизованным антителом или полностью гуманизованным антителом и относится к антителу, которое имеет цепь, содержащую переменную область от мышиного антитела (как в химерном антителе), и другую цепь, содержащую переменную область гуманизованного антитела.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором последовательность переменной области происходит от одного вида, а последовательность константной области происходит от другого вида, например, антитело, в котором последовательность переменной области происходит от мышиного антитела, а последовательность константной области происходит от человеческого антитела. Химерные антитела или их фрагменты в соответствии с настоящей заявкой могут быть получены путем использования методов генетической рекомбинации. Например, химерное антитело может быть получено путем клонирования рекомбинантной ДНК, содержащей промотор и последовательность, кодирующую переменную область нечеловеческого, в частности, мышиного, моноклонального

антитела в соответствии с настоящей заявкой, и последовательность, кодирующую константную область человеческого антитела. Химерные антитела в соответствии с настоящей заявкой, кодируемые такими рекомбинантными генами, будут представлять собой, например, химерную конструкцию «мышь-человек», и ее специфичность определяется переменными областями, происходящими из мышиной ДНК, а ее изоформы определяются константными областями, происходящими из ДНК человека. Рекомендации по способу получения химерного антитела можно найти, например, у Verhoeven и др. (BioEssays, 8: 74, 1988).

Термин «моноклональное антитело» относится к препарату на основе молекул антител, имеющих одинаковый молекулярный состав. Композиции на основе моноклональных антител проявляют специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему способностью связываться с двумя антигенными эпитопами. Эти два эпитопа могут принадлежать разным антигенам или одному и тому же антигену. Биспецифические антитела могут иметь разнообразные структурные конфигурации. Например, биспецифическое антитело может состоять из двух Fc-фрагментов и двух слитых с ними связывающих группировок, соответственно (аналогично нативному антителу, за исключением того, что два плеча связываются с разными антигенными мишенями или эпитопами). Антигенсвязывающая группировка может представлять собой одноцепочечное антитело (scFv) или антигенсвязывающий фрагмент (Fab).

Использованный в данном описании термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится, в частности, к фрагментам антител, таким как фрагмент Fv, scFv (sc означает «одноцепочечный»), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc или диатело, либо любому фрагменту, способному увеличивать период полувыведения в результате химической модификации или посредством включения в липосомы, например, путем добавления поли(алкилен)гликолей, таких как полиэтиленгликоль (путем «ПЭГилирования») (называемым ПЭГилированными фрагментами Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG или Fab'-PEG) («PEG» представляет собой полиэтиленгликоль). Антигенсвязывающий фрагмент антитела к CLDN18.2 в соответствии с настоящей заявкой обладает CLDN18.2-связывающей активностью. Например, антигенсвязывающий фрагмент состоит из части последовательности переменной области тяжелой или легкой цепи антитела, из которого он происходит, или содержит ее. Этой части последовательности достаточно

для сохранения такой же специфичности связывания и достаточной аффинности, что и у антитела, из которого она происходит, и она может содержать по меньшей мере 5 аминокислот, предпочтительно 10, 15, 25, 50 и 100 смежных аминокислот из последовательности антитела, из которого она происходит.

Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются этим, (1) Fab фрагменты, которые могут представлять собой одновалентные фрагменты, имеющие цепи VL-CL и цепи VH-CH1; (2) F(ab')₂ фрагменты, которые могут представлять собой двухвалентные фрагменты, имеющие два Fab' фрагмента, связанных дисульфидными мостиками в шарнирной области (т.е. димеры Fab'); (3) Fv фрагменты, имеющие VL- и VH-домены от одного плеча антитела; (4) одноцепочечный Fv (scFv), который может представлять собой единую полипептидную цепь, состоящую из VH-домена и VL-домена, соединенных через пептидный линкер; и (5) фрагмент (scFv)₂, который может содержать два VH-домена, соединенных посредством пептидного линкера, и два VL-домена, которые объединены с этими двумя VH-доменами через дисульфидные мостики.

Термины «Fc-фрагмент», «Fc-домен», «Fc-группировка» или тому подобные относятся к части константной области тяжелой цепи антитела, включающей шарнирную область, фрагмент CH2 и фрагмент CH3 константной области.

Обычно, чтобы получить моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, мышинное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно найти указания среди методов, описанных в учебнике «Антитела» (Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988), или методов, используемых для получения моноклонального антитела из гибридомных клеток, описанных Kohler и Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975).

В соответствии с информацией по структуре заданного моноклонального антитела к CLDN18.2, приведенной в настоящей заявке, моноклональное антитело может быть получено в клетках CHO-K1 (яичников китайского хомячка, субклона K1; номер в Американской коллекции типовых культур (ATCC): CCL-61, № партии: 59965043) с использованием способов, известных в данной области техники.

Термин «гомология/идентичность» в контексте аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности определяется как процентное содержание идентичных остатков в варианте аминокислотной или нуклеотидной

последовательности, которое после выравнивания и введения разрывов, достигает максимального процента гомологии, если это требуется. Методы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области техники.

Термин «специфическое связывание» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как связывание антитела с антигенным эпитопом.

Авторы настоящей заявки первыми получили моноклональное антитело к CLDN18.2, которое связывалось с CLDN18.2 на CLDN18.2-положительных клетках, опосредовало высокоэффективную интернализацию и оказалось особенно подходящим для разработки ADC. В процессе дальнейшей разработки ADC авторы настоящей заявки обнаружили, что превосходная стабильность конъюгирования линкера и молекулы лекарственного средства достигалась при использовании NH₂-PEG₃-Val-Cit в качестве линкера, на основании чего гуманизированное антитело конъюгировали через этот линкер с низкомолекулярным лекарственным средством (например, MMAE), и при использовании полученного лекарственного средства в форме ADC были достигнуты очень сильный эффект уничтожения в отношении CLDN18.2-сверхэкспрессирующих раковых клеток, в частности, клеток рака поджелудочной железы, рака желудка и рака легкого, и хорошая стабильность. В частности, в экспериментах *in vivo* было показано, что внутривенное введение конъюгата антитело-лекарственное средство бестимусным мышам с ксенотрансплантатами CLDN18.2-положительной опухоли желудка или поджелудочной железы приводило к ингибированию роста опухоли дозозависимым образом. Значительные терапевтические эффекты были обнаружены при однократном внутривенном введении в дозе примерно 1-8 мг/кг. Наилучший терапевтический эффект был обнаружен в дозе 8 мг/кг. Индивиды показывали хорошую переносимость. Общий терапевтический эффект был значительным. Лекарственное средство в форме ADC, полученное в настоящей заявке, может привести к эффекту «свидетеля», благодаря чему может быть дополнительно усилен терапевтический эффект.

Согласно одному из аспектов в настоящей заявке предложены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способное(ый) специфически связываться с CLDN18.2. В частности, антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом (1) тяжелая цепь содержит три участка CDR, и аминокислотная последовательность по меньшей мере одного из участков CDR представляет собой аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или последовательность, имеющую по меньшей

мере 80% (предпочтительно 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1, 2 или 3; и/или (2) легкая цепь содержит три участка CDR, и аминокислотная последовательность по меньшей мере одного из участков CDR представляет собой аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, 5 или 6, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80% (предпочтительно 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, 5 или 6.

В некоторых конкретных воплощениях антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом (1) тяжелая цепь содержит три участка CDR, имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно; и/или (2) легкая цепь содержит три участка CDR, имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой находится в выделенной форме.

В некоторых воплощениях тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и/или легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых воплощениях тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых воплощениях антителами в соответствии с настоящей заявкой являются моноклональные антитела.

В некоторых воплощениях антителами в соответствии с настоящей заявкой являются биспецифические антитела. Например, одно плечо биспецифического антитела может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab или scFv) антитела к CLDN18.2, описанного в данной заявке, а другое плечо может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab или scFv), который нацелен на другой антиген (например, другие антигены-мишени, пригодные для конструкции в форме ADC) или другой эпитоп CLDN18.2 (например, отличающийся от эпитопа CLDN18.2, с которым связывается антитело, описанное в данной заявке).

В некоторых воплощениях антителами в соответствии с настоящей заявкой являются гуманизированные антитела, в том числе полугуманизированные антитела и

полностью гуманизированные антитела.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой обладает активностью в форме антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой обладает активностью в форме комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой специфически связывается с CLDN18.2, при этом по существу не связывается с CLDN18.1.

В некоторых воплощениях антитело содержит константную область тяжелой цепи подтипа IgG1, подтипа IgG2 или подтипа IgG4.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи антитела может относиться к подтипу IgG1 человека, подтипу IgG2 человека, подтипу IgG4 человека, подтипу IgG1 мыши или подтипу IgG2a мыши.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи относится к подтипу IgG1, т.е. к антителу IgG1 типа.

В некоторых воплощениях антитело содержит константную область легкой цепи подтипа κ или подтипа λ .

В некоторых воплощениях константная область легкой цепи антитела может относиться к подтипу κ человека, подтипу λ человека, подтипу κ мыши или подтипу λ мыши.

В некоторых воплощениях антитело в соответствии с настоящей заявкой представляет собой антитело IgG1 κ типа.

В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой полезен для лечения или предупреждения рака, при этом данный рак сверхэкспрессирует CLDN18.2.

В одном из воплощений антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с природным эпитопом CLDN18.2, присутствующим на поверхности живой клетки. В одном из воплощений антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с внеклеточным доменом CLDN18.2. В одном из воплощений антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связывается с первой внеклеточной областью CLDN18.2.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело в соответствии с настоящей заявкой.

Согласно еще одному аспекту настоящей заявки предложена комбинация выделенных полинуклеотидов, содержащая полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой, и полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в данной заявке, или комбинацию полинуклеотидов, описанных в данной заявке, функционально связанных с регуляторной последовательностью, которая обеспечивает осуществление экспрессии полипептида, кодируемого полинуклеотидом(ами) в клетке хозяина или в бесклеточной системе экспрессии.

В некоторых воплощениях в соответствии с настоящей заявкой клеткой хозяина может быть прокариотическая клетка-хозяин, эукариотическая клетка-хозяин или фаг. Прокариотической клеткой хозяина может быть *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* или *Proteus mirabilis*. Эукариотической клеткой хозяина могут быть грибы, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces cerevisiae* или *Trichoderma*, клетки насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda*, либо клетки растений, такие как клетки табака, клетки млекопитающих, такие как клетки почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК), клетки CHO, клетки почки африканской зеленой мартышки (COS), либо миеломные клетки. В некоторых воплощениях в качестве клетки хозяина в данной заявке описаны предпочтительно клетки млекопитающих, более предпочтительно клетки ВНК, клетки CHO, клетки NSO или клетки COS.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к CLDN18.2 или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящей заявкой, конъюгированное(ый) с одной или несколькими молекулами лекарственного средства. Воплощения и признаки антитела к CLDN18.2 или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с настоящей заявкой описаны выше.

Поскольку CLDN18.2 в первую очередь является молекулярной мишенью в случае раковых/опухолевых клеток, то в некоторых воплощениях молекула лекарственного средства представляет собой противораковое лекарственное средство. Однако,

специалистам в данной области техники будет очевидно, что, когда CLDN18.2 является мишенью при заболеваниях, отличающихся от рака/опухоли, то молекула лекарственного средства может быть выбрана в соответствии с представляющим интерес заболеванием.

Противораковые лекарственные средства включают, но не ограничиваются этим, цитотоксическое лекарственное средство, иммуностимулятор или радиоактивный изотоп.

В некоторых воплощениях цитотоксическое лекарственное средство включает ингибитор тубулина (например, алкалоид), ингибитор ДНК-топоизомеразы, ДНК-повреждающий агент, антимераболит или противоопухолевый антибиотик.

В некоторых воплощениях ингибитор тубулина включает, но не ограничивается этим, производное ауристатина (например, ММАЕ (монометилауристатин Е), ММАF (монометилауристатин F)) или производное алкалоида майтансина (например, DM1 (N2'-дезацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтансин), DM4 (N2'-дезацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтансин), ансамитоцин, мертанзин или доластатин либо их производное).

В некоторых воплощениях ингибитор ДНК-топоизомеразы представляет собой аналог камптотецина или ингибитор ДНК-топоизомеразы I либо их производное, как например, DXD, SN38, иринотекан, иринотекана гидрохлорид, камптотецин, 9-аминокамптотецин, 9-нитрокамптотецин, 10-гидроксикамптотецин, 9-хлор-10-гидроксикамптотецин, 22-гидроксиакуминатин, топотекан, лертонотекан (lertonotecan), белотекан, икситекан (ixitecan), гомосилатекан, 6,8-дибром-2-метил-3-[2-(D-ксилопиранозиламино)фенил]-4(3H)-хиназолинон, 2-циано-3-(3,4-дигидроксифенил)-N-(фенилметил)-(2E)-2-акриламид, 2-циано-3-(3,4-дигидроксифенил)-N-(3-гидроксифенилпропил)-(E)-2-акриламид, 12-β-D-глюкопиранозил-12,13-дигидро-2,10-дигидрокси-6-[[2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этил]амино]-5H-индолиндоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7(6H)-дион, N-[2-(диметиламино)этил]-4-акридин-формамида дигидрохлорид, N-[2-(диметиламино)этил]-4-акридинкарбоксамид.

В некоторых воплощениях ДНК-повреждающий агент включает, но не ограничивается этим, калихеамицин, дуокармицин или пирролобензодиазепин (PBD) (производное антрамицина).

В некоторых воплощениях усилитель иммунного ответа включает, но не ограничивается этим, левамизол, пидотимод, имиквимод, изоинозин, комплекс полиинозиновой:полицитидиловой кислот или комплекс

полиинозиновой:полиуридиловой кислот.

В некоторых воплощениях антиметаболит включает, но не ограничивается этим, метотрексат, 6-меркаптопурин или 5-фторурацил.

В некоторых воплощениях противоопухолевые антибиотики включают, но не ограничиваются этим, полипептидные антибиотики (например, актиномицин D или блеомицин) или антрахиноны (например, доксорубицин или митоксантрона гидрохлорид).

В некоторых воплощениях радиоактивный изотоп включает, но не ограничивается этим, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co или ^{177}Lu .

В некоторых воплощениях антитело, обладающее способностью связываться с CLDN18.2, связано ковалентной связью с группировкой лекарственного средства посредством линкера. В некоторых воплощениях линкером является расщепляемый линкер. В некоторых воплощениях линкер может расщепляться под действием внутриклеточных условий. В одном из воплощений линкер может расщепляться при pH меньше 5,5. В некоторых воплощениях линкер может расщепляться под действием внутриклеточной протеазы. В некоторых воплощениях линкер представляет собой расщепляемый катепсином линкер. В некоторых воплощениях линкер содержит дипептид. В некоторых воплощениях дипептидом является валин (Val)-цитруллин (Cit). В некоторых воплощениях антитело соединено с линкером через тиоловую группу остатка цистеина в антителе. В одном из воплощений антитело соединено с линкером через аминогруппу в антителе, в частности, аминогруппу остатка глутамина.

Неограничивающие примеры линкеров включают малеимидакапроил(mc)-Val-Cit-pAB (*-para*-аминобензил), mc-Val-Cit-pABC (*-para*-аминобензилоксикарбонил), mc-Val-Cit, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit}$, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pAB}$, где m равно целому числу от 1 до 8.

В некоторых воплощениях конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в данной заявке, имеют общую формулу Ab-(L-U)_n , где Ab представляет собой антитело к CLDN18.2 в соответствии с настоящей заявкой, L представляет собой линкер (например, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit}$, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pAB}$, $\text{NH}_2\text{-(PEG)}_m\text{-Val-Cit-pABC}$, mc-Val-Cit-pAB или Val-Cit, где m представляет собой количество молекул PEG, которое может быть равно целому числу от 1 до 8), а U представляет собой лекарственное средство (например, DM1, DM4, MMAE, MMAF, DXD и SN38), и n представляет собой соотношение лекарственного средства и антитела (DAR). Величина DAR может

представлять собой среднее значение и может быть равна любому значению (не ограничиваясь целым числом, но также может представлять собой десятичное число) от 1 до 8, предпочтительно целому числу от 1 до 8, более предпочтительно 2, 4, 6, 8, еще более предпочтительно 2.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен фармацевтический препарат (например, фармацевтическая композиция), содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с настоящей заявкой и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или эксципиент.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложено изделие медицинского назначения, содержащее конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с настоящей заявкой. В некоторых воплощениях изделие медицинского назначения находится в форме набора, включающего в себя контейнер, содержащий конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с настоящей заявкой. В одном из воплощений изделие медицинского назначения дополнительно содержит отпечатанные инструкции по применению данного изделия в способе лечения или предупреждения рака, в частности рака, экспрессирующего CLDN18.2.

Предложенные в данной заявке конъюгаты антитело-лекарственное средство эффективны для лечения и/или предупреждения рака, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CLDN18.2 (CLDN18.2-положительными клетками). В качестве неограничивающего примера такой рак может представлять собой рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рак яичника, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи или рак желчного пузыря и метастазы вышеупомянутого рака, в частности метастазы рака желудка, метастазы в брюшину и метастазы в лимфатические узлы. Раковым заболеванием, подходящим для лечения конъюгатом антитело-лекарственное средство, предложенным в данной заявке, могут быть аденокарциномы желудка, пищевода, протока поджелудочной железы, желчного протока, легкого и яичника. Предложенные в данной заявке конъюгаты антитело-лекарственное средство особенно подходят для лечения рака желудка и рака поджелудочной железы.

Таким образом, в настоящей заявке дополнительно представлены воплощения изобретения, относящиеся к вышеупомянутому терапевтическому применению.

Согласно одному из аспектов в настоящей заявке предложено применение описанного выше конъюгата на основе антитела для изготовления лекарственного

средства для лечения или предупреждения рака.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества конъюгата на основе антитела или фармацевтического препарата либо фармацевтической композиции, содержащей описанный выше конъюгат.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложено применение описанного выше конъюгата на основе антитела и антипролиферативного агента для изготовления лекарственного средства для лечения опухоли, например, описанного выше рака.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложена фармацевтическая композиция, содержащая описанный выше конъюгат на основе антитела и антипролиферативный агент.

Согласно другому аспекту настоящей заявки предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту, страдающему от рака, терапевтически эффективного количества конъюгата на основе антитела или фармацевтического препарата либо фармацевтической композиции, содержащей описанный выше конъюгат на основе антитела и антипролиферативный агент.

В конкретных воплощениях антипролиферативный агент включает, но не ограничивается этим, паклитаксел, доксорубицин, доцетаксел, цисплатин, карбоплатин или изоплатин. В некоторых воплощениях антипролиферативным агентом также может быть другое антитело, другой конъюгат антитело-лекарственное средство или слитый белок.

Примеры

Следующие далее примеры приведены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящей заявки.

Оборудование и материалы для проведения экспериментов

| Прибор и оборудование | Производитель | Модель |
|--|----------------------|--------------------------|
| Проточный цитометр | Thermo Fisher | Attune® NxT |
| Инкубатор с двуокисью углерода | Thermo Fisher | Тип 3111 |
| Бокс биологической безопасности | Thermo Fisher | Серия 1300, A2, 6 дюймов |
| Настольная высокоскоростная центрифуга с охлаждением | Thermo Fisher | SORVALL Stratos |

| | | |
|--|-------------------|---------------------------------|
| Инвертированный микроскоп | Olympus | Инвертированный микроскоп СКХ31 |
| Инкубатор с двуокисью углерода | Thermo Fisher | Тип 3111 |
| Лазерный конфокальный микроскоп | Olympus | FV3000 |
| Микропланшетный ридер | Tecan | M200 |
| 96-луночный прозрачный планшет с плоским дном для культивирования клеток | Corning | 3599 |
| 96-луночный черный планшет с плоским дном для культивирования клеток | Corning | 3603 |
| Резервуар для разведения образцов | BIOFIL | LTT012100, 100 мл |
| Реагенты для мечения IgG с использованием флуоресценции (iFL IgG) Zenon™ pHrodo™ | Invitrogen | Z25611 |
| Пипетка | Eppendorf | Research Plus |
| 96-луночный культуральный планшет с V-образными лунками | Corning | 3897 |
| Пробирка для центрифуги емкостью 50 мл | Corning | 430828 |
| Пробирка для центрифуги емкостью 15 мл | Corning | 430790 |
| Матрасы для культивирования клеток T75 | Corning | 430641 |
| Матрасы для культивирования клеток T25 | Corning | 430639 |
| DPBS (PBS-буфер по Дульбекко) | BBI | E607009-0500 |
| 1 × жидкость фокусирующая | Life Technologies | A24904 |
| 1 × жидкость для остановки реакции | Life Technologies | A24975 |
| Жидкость для промывки | Life Technologies | A24974 |

| | | |
|--|------------|-------------|
| Фетальная телячья сыворотка | Gibco | 10099-141C |
| Модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) | HyClone | SH30243.01 |
| Среда от Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI) | HyClone | SH30809.01 |
| Резазурина натриевая соль | Sigma | 199303-25G |
| Раствор, содержащий антибиотики и антимикотики (AntiAnti) (100x) | Gibco | 15240-062 |
| Среда DMEM с питательной смесью Хэма F12 (DMEM/F-12) | Gibco | C11330500BT |
| 0,25% трипсин-EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) | Gibco | 25200-072 |
| Пуромицин | Thermo | A1113802 |
| G418 | Sigma | a1720-5g |
| Козье перекрестно связывающееся вторичное антитело к IgG (H+L) человека, Alexa Fluor 488 | Invitrogen | A11013 |

Клеточные линии, использованные в экспериментах

| Название | Производитель | Условия культивирования |
|-------------------------------------|------------------------------|--|
| HEK293-CLDN18.2 человека (hu) | Собственного изготовления | Полная среда DMEM + G418 (200 мкг/мл) |
| HEK293-CLDN18.2 мыши | Kangyuan Baochuang | Полная среда DMEM + пурамицин (0,5 мкг/мл) |
| CHO-K1-CLDN18.2 яванского макака | Gemini Bio | Полная среда DMEM/F-12. Номер в ATCC: CCL-61, № партии: 59965043 |
| HEK293-CLDN18.1 | Собственного изготовления | Полная среда DMEM + G418 (200 мкг/мл) |
| HEK 293 | Nanjing Kebai | Полная среда DMEM |
| КАТОIII | Nanjing Kebai | Полная среда RPMI |
| NCI-N87-CLDN18.2 | Kangyuan Baochuang | Полная среда RPMI + пурамицин (0,5 мкг/мл) |

| | | |
|-------------------|---------------------------|--|
| NCI-H460-CLDN18.2 | Собственного изготовления | Полная среда RPMI + пурамицин (1 мкг/мл) |
| NUG4-CLDN18.2 | Собственного изготовления | Полная среда RPMI + G418 (500 мкг/мл) |
| PATU8988S | Nanjing Kebai | Полная среда DMEM |
| VxPC-3-CLDN18.2 | Kangyuan Baochuang | Полная среда DMEM + пурамицин (1 мкг/мл) |

Пример 1. Получение полностью человеческого моноклонального антитела к CLDN18.2

Антитела к CLDN18.2, использованные в настоящей заявке, получали посредством иммунизации мышей, трансгенных по Ig человека. Трансгенных мышей иммунизировали клетками CHO или клетками 3T3, трансфицированными ДНК, кодирующей CLDN18.2 человека. Иммуногены вводили внутривенно (в.в.), подкожно (п.к.) или в подушечку стопы (fp), или в хвост мышей. Иммунный ответ тестировали путем периодического определения титра антител к CLDN18.2 в плазме крови. Мышей с достаточным титром антител к CLDN18.2 в плазме крови использовали для слияния с образованием гибридом. Иммунопотенцирование проводили путем инъекции иммуногенов в брюшину, подушечки лап или хвостовую вену мышей перед окончательным извлечением селезенки и лимфатических узлов у мышей.

Образцы сыворотки крови от иммунизированных мышей подвергали скринингу с использованием флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS). Отбирали мышей, продуцирующих антитела, связывающиеся с CLDN18.2. Сначала линии экспрессирующих CLDN18.2 клеток (CHO или 3T3) инкубировали с образцами сыворотки крови иммунизированных мышей в градиентном разбавлении. Затем детектировали специфическое связывание антител, используя флуоресцентно меченное фикоэритрином (PE) Ab к IgG мыши, на устройстве для флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (iQue plus, Sartorius). Помимо этого, результаты для образцов сыворотки крови мышей подтверждали путем тестирования с использованием визуализации. Клетки CHO (или клетки 3T3), экспрессирующие CLDN18.2, инкубировали с разбавленными образцами сыворотки крови от иммунизированных мышей. Далее клетки промывали, фиксировали формальдегидом и промывали еще раз. Специфическое связывание антител детектировали, используя флуоресцентно меченное

Alexa488 козье антимышиное антитело со сканированием и анализом на устройстве для визуализации клеток (Cytation 5, Biotek). После идентификации мышей, продуцирующих антитела, которые связываются с CLDN18.2, из иммунизированных мышей извлекали селезенку и лимфатические узлы. Лимфоциты выделяли, осуществляли слияние с клетками Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) миеломы мыши, используя метод электрослияния. Полученные гибридомы подвергали скринингу на специфичные к CLDN18.2 антитела. Клетки высевали в 96-луночные планшеты для культур тканей с лунками с плоским дном, инкубировали в селективной среде (среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (HAT)) в течение 2 недель и затем для дальнейшего культивирования переносили в среду для гибридом. Приблизительно через 10-14 суток после высева клеток супернатанты гибридомной культуры из отдельных лунок подвергали специфическому связыванию с антителом к CLDN18.2 с визуализацией вышеупомянутым методом скрининга клеточной визуализации. Соответствующие гибридомные клетки отбирали из гибридом, полученных в группе из трех мышей после иммунизации. Гибридомные клетки, полученные методом электрослияния после иммунизации мышей, высевали в 96-луночные планшеты для культивирования тканей с лунками с плоским дном, при этом каждая лунка содержала одну или несколько гибридомных клеток. Супернатант гибридомной культуры из отдельной лунки тестировали методами визуализации клеток и отбирали супернатант от клона, секретирующего положительные антитела, специфически связывающиеся с клетками CHO, трансфицированными CLDN18.2, но не с клетками CHO или клетками CHO, трансфицированными CLDN18.1. Гибридомы, секретирующие положительные антитела, переносили в 24-луночные планшеты и подвергали повторному скринингу для подтверждения результатов. Гибридомы, продуцирующие антитела с подтвержденным положительным результатом, отсортировывали, используя сортировщик отдельных клеток. Каждую положительную гибридому отсортировывали на 96 субклонов, которые подвергали повторному скринингу для подтверждения результатов. Положительные субклоны, которые продуцировали предварительные молекулы-кандидаты, культивировали *in vitro* для проведения секвенирования. Небольшие количества антител, продуцированных положительными субклонами, использовали для очистки, определения характеристик и валидации. Полученное антитело SYJS001 имеет приведенные ниже релевантные последовательности.

Таблица 1

| Область/ систематика антитела | Определение CDR согласно IMGT: |
|--|---|
| FR-H1 | EVQLSESGGALVQPGESELRSLCAAS (SEQ ID NO: 11) |
| CDR-H1 | GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1) |
| FR-H2 | MTWVRQAPGKGLEWVSS (SEQ ID NO: 12) |
| CDR-H2 | LSGSGRST (SEQ ID NO: 2) |
| FR-H3 | YYAASIKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYC (SEQ ID NO: 13) |
| CDR-H3 | AKSLSYHYHYYFDY (SEQ ID NO: 3) |
| FR-H4 | WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14) |
| FR-L1 | DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRAS (SEQ ID NO: 15) |
| CDR-L1 | QDISNY (SEQ ID NO: 4) |
| FR-L2 | LAWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 16) |
| CDR-L2 | SAS (SEQ ID NO: 5) |
| FR-L3 | TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFASYHC (SEQ ID NO: 17) |
| CDR-L3 | QQVKTYPLT (SEQ ID NO: 6) |
| FR-L4 | FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 18) |

SEQ ID NO: 7 (вариабельная область тяжелой цепи)

EVQLSESGGALVQPGESELRSLCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRS
 TYAASIKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYCAKSLSYHYHYYFDYWGQGT
 LTVTVSS

SEQ ID NO: 8 (вариабельная область легкой цепи)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQSGVP
 SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFASYHCQQVKTYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 9 (тяжелая цепь)

EVQLSESGGALVQPGESELRSLCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRS
 TYAASIKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYCAKSLSYHYHYYFDYWGQGT
 LTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10 (легкая цепь)

DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFASYHCQQVKTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 2. Конструкция вектора и экспрессия антитела

2.1. Конструирование вектора

Плазмидный вектор pGenHT1.0-DGV, использованный для экспрессии моноклонального антитела SYJS001, был предоставлен Nanjing GenScript Biotechnology Co., Ltd. («GenScript»). Карта вектора показана на ФИГ. 3, а информация о ключевых компонентах показана в Таблице 2.

Таблица 2. Информация о ключевых компонентах вектора pGenHT1.0-DGV

| Компонент | Название | Функция |
|--------------|---|--|
| CMV промотор | цитомегаловирусный промотор | Управление транскрипцией чужеродного гена |
| NeoR/KanR | гены устойчивости к неомицину и устойчивости к канамицину | Скрининг положительных клонов клетки хозяина и <i>Escherichia coli</i> |
| ген GS | ген глутаминсинтетазы | Экспрессия глутаминсинтетазы |

В этом исследовании в GenScript проводили синтез последовательностей ДНК тяжелой и легкой цепей SYJS001 и экспрессионного вектора pGenHT1.0-DGV.

Конструирование и синтез тяжелой цепи

Синтезированную тяжелую цепь обозначали как SYJS001-НС. На 5'-конец вводили сайт эндонуклеазы NruI, на 3'-конец вводили сайт эндонуклеазы PmlI, после сайта эндонуклеазы NruI на 5'-конце вводили последовательность Козака и вводили последовательность сигнального пептида (19 аминокислот, MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 19)). Конструкция последовательности для экспрессии тяжелой цепи приведена ниже:

NruI-последовательность Козака-сигнальный пептид-SYJS001-НС-стоп-кодон-PmlI.

Конструирование и синтез легкой цепи

Синтезированную легкую цепь обозначали как SYJS001-LC. В процессе синтеза на 5'-конец вводили сайт эндонуклеазы AscI, на 3'-конец вводили сайт эндонуклеазы FseI, после сайта эндонуклеазы AscI на 5'-конце вводили последовательность Козака и вводили последовательность сигнального пептида (19 аминокислот, MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 19)). Конструкция последовательности для экспрессии легкой цепи приведена ниже:

AscI-последовательность Козака-сигнальный пептид-SYJS001-LC-стоп-кодон-FseI.

2.2. Конструкция рекомбинантного вектора

Сайт вставки SYJS001-НС представляет собой поликлональный сайт для NruI/PmlI, расположенный ниже по ходу транскрипции в векторе pGenHT1.0-DGV, а сайт вставки SYJS001-LC представляет собой поликлональный сайт, для AscI/FseI, расположенный выше по ходу транскрипции. Промоторы обоих сайтов множественного клонирования представляли собой CMV промоторы. Тяжелую и легкую цепи конструировали в одном и том же пустом векторе. Продукт амплификации SYJS001-НС с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и плазмидный вектор pGenHT1.0-DGV подвергали двойному расщеплению ферментами NruI/PmlI и трансформации путем лигирования. Положительные клоны подвергали скринингу с использованием маркера устойчивости Kan⁺, получая соответствующий экспрессионный вектор для рекомбинантной тяжелой цепи, который обозначали как «SYJS001-НС в pGenHT1.0-DGV». Далее легкую цепь SYJS001-LC и «SYJS001-НС в pGenHT1.0-DGV» подвергали двойному расщеплению ферментами AscI/FseI, трансформации путем лигирования и проводили скрининг клонов. Положительные клоны подвергали расщеплению под действием AscI/PmlI (см. ФИГ. 4) и секвенированию, получая соответствующий экспрессионный вектор для рекомбинантной тяжелой и легкой цепи, который обозначали как «SYJS001 в pGenHT1.0-DGV» со структурой, показанной на ФИГ. 5. Вектор «SYJS001 в pGenHT1.0-DGV» подвергали двойному расщеплению ферментами для подтверждения полученного результата. Последовательность целевой области имела длину 4527 п.о. Полученную рекомбинантную плазмиду использовали для электропорации клетки хозяина CHO-K1 с получением клеточного штамма со стабильной и высокой экспрессией антитела SYJS001.

2.3. Экспрессия и очистка антител

Клеточный штамм со стабильной и высокой экспрессией антитела SYJS001 инкубировали в «матрасах» в бессывороточной среде с заданным химическим составом

CD FortI CHO. После определенного периода времени собирали культуральные супернатанты. Колонки HiTrap MabSelect SuRe объемом 1 мл уравнивали раствором PBS (pH 7,4; в количестве 10 объемов колонки) (GE Healthcare Life Sciences, № по каталогу 11-0034-93) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Культуральные супернатанты загружали после фильтрования через мембрану с размером пор 0,45 мкм со скоростью потока 0,5 мл/мин. Колонки промывали раствором PBS (pH 7,4; в количестве 5-10 объемов колонки) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Элюирование проводили, используя 100 мМ буфер на основе лимонной кислоты (pH 3,6), со скоростью потока 0,5 мл/мин и собирали элюированные фракции, получая антитело SYJS001 с чистотой выше 95%.

Пример 3. Получение ADC на основе SYJS001

Определенное количество L&D (со структурой, показанной на ФИГ. 2), реакционный буфер, антитело SYJS001, mTGase (трансглутаминазу) и H₂O переносили в соответствующем порядке с использованием перистальтического насоса в эластичный одноразовый реакционный резервуар из этилен-винилацетата. Реакционный резервуар герметично закрывали, реагенты смешивали и инкубировали при 30°C в течение реакционного периода 24-144 ч. Степень связывания определяли в анализе с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на C4-колонке каждые 24 часа в ходе реакции. Когда степень связывания составляла не менее 95%, реакцию останавливали и продукт реакции незамедлительно очищали.

Используемая трансглутаминаза имела следующую аминокислотную последовательность:

DSDERTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQ
REWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRV
AKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDAR
SPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFR
PDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHA
PNGSLGAMHVYESKFRNWSGDYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ
ID NO: 20).

Пример 4. Анализ и характеристика физико-химических свойств ADC на основе SYJS001

1. Определение степени модификации ADC на основе SYJS001

Методики эксперимента:

1) загрузка: из восстановленного образца продукта реакции ADC отбирали 10 мкл

супернатанта и наносили на хроматографическую колонку (XBridge C4; 3,5 мкм, 4,6 мм x 250 мм, от Waters);

2) элюирование: в качестве подвижной фазы А использовали 0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты (TFA), а в качестве подвижной фазы В использовали 0,1%-ный раствор ацетонитрила. Соотношение подвижных фаз А:В устанавливали равным 9:1, 7:3, 6,5:3,5; 6:4; 5,5:4,5; 5:5; 1:9 и 9:1 для элюирования в моменты времени 0, 5, 8, 15, 20, 22, 25 и 30 мин, соответственно. Скорость потока регулировали на уровне 0,8 мл/мин, и длина волны детектирования составляла 280 нм.

Как показывают результаты эксперимента, приведенные на ФИГ. 6, степень модификации ADC на основе SYJS001 составляла 95,11%.

2. Измерение DAR для ADC на основе SYJS001

Методики эксперимента:

1) загрузка: 10 мкг образца ADC на основе SYJS001 наносили на хроматографическую колонку (PLRP-S, 5 мкм, 2,1 мм x 50 мм, от Agilent);

2) элюирование: в качестве подвижной фазы А использовали 0,1%-ный водный раствор TFA, а в качестве подвижной фазы В использовали 0,1%-ный раствор ацетонитрила. Соотношение подвижных фаз А:В устанавливали равным 7,3:2,1; 6,5:3,5; 5,7:4,3; 0,5:9,5 и 7,3:2,7 для элюирования в моменты времени 0, 8, 25, 26 и 31,5 мин, соответственно. Скорость потока регулировали на уровне 0,25 мл/мин, и длина волны детектирования составляла 280 нм.

Как показано на ФИГ. 7, среднее значение DAR составляло 2.

Пример 5. Детекция связывания ADC на основе SYJS001 с CLDN18.2 с применением проточной цитометрии

Способность ADC на основе SYJS001 связываться с CLDN18.2 разных видов определяли методом проточной цитометрии.

Линии сверхэкспрессирующих клеток (HEK293-CLDN18.2 человека, HEK293-CLDN18.2 мыши, CHO-K1-CLDN18.2 яванского макака) инкубировали с образцом ADC на основе SYJS001 в разных концентрациях и затем инкубировали с IgG-связывающим вторичным антителом (козьим перекрестно связывающимся вторичным антителом к IgG (H+L) человека). Для анализа способности образца связываться с CLDN18.2 разных видов измеряли значения сигнала флуоресценции для разных концентраций методом проточной цитометрии.

Методики эксперимента

Образец ADC на основе SYJS001 разбавляли в градиентном 3-кратном отношении, начиная от 45 мкг/мл, с получением в общей сложности 11 концентраций. По 100 мкл раствора образца в разных концентрациях инкубировали с клетками, экспрессирующими CLDN18.2 человека, мыши и яванского макака (1×10^6 клеток/мл, 100 мкл/лунка), при 4°C в течение 1,5 ч. Несвязавшиеся образцы удаляли путем промывки клеток и добавляли козье перекрестно связывающееся вторичное антитело к IgG (H+L) человека (в разведении 1:1000) для инкубации в течение 1 ч при 4°C. Анализ данных проводили, применяя программное обеспечение GraphPad Prism 5. Для аппроксимации «S»-кривой выбирали регрессионную модель в виде четырехпараметрического уравнения, и это программное обеспечение автоматически выдавало полуэффективную дозу (ED₅₀) (значение концентрации (C)). Как показано на ФИГ. 8 и в Таблице 3, ADC на основе SYJS001 обладал хорошей аффинностью в отношении CLDN18.2 человека, мыши и яванского макака.

Таблица 3. Значения ED₅₀ для ADC на основе SYJS001 при связывании с CLDN18.2 разных видов

| Название образца | ED ₅₀ (нг/мл) |
|----------------------------------|--------------------------|
| HEK293-CLDN18.2 человека | 439,1 |
| HEK293-CLDN18.2 мыши | 717,0 |
| CHO-K1-CLDN18.2 яванского макака | 647,9 |

Пример 6. Специфическое связывание ADC на основе SYJS001 с CLDN18.2

6.1. Специфичность и перекрестное действие моноклонального антитела SYJS001 в отношении членов семейства CLDN18

Клетки CHO-K1-CLDN18.2 и HEK293-CLDN18.1 культивировали, используя надлежащие полные среды, соответственно, и осуществляли пассажи каждые 2-3 суток. Когда степень слияния клеток достигала 90%, клеточную суспензию с плотностью клеток, подведенной полной средой до $2-3 \times 10^6$ клеток/мл, высевали в проточные 96-луночные используемые в анализе планшеты, применяя многоканальную пипетку, в количестве по 100 мкл на одну лунку. Планшеты центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Планшеты дважды промывали смесью 2% фетальной телячьей сыворотки (FBS)/PBS. Моноклональное антитело SYJS001 разбавляли буфером на основе 2% FBS/PBS в градиентном 3-кратном отношении,

начиная с концентрации 6 мкг/мл, с получением 8 концентраций. Готовили по два повтора для каждой концентрации и соответствующий пустой контроль. Из расчета на одну лунку добавляли по 100 мкл раствора антитела в каждом разведении и планшеты инкубировали при 4°C в течение 2 ч. После трехкратной промывки планшетов смесью 2% FBS/PBS добавляли 488-меченное козье антитело к IgG человека (в разведении 1:5000) и планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшетов смесью 2% FBS/PBS планшеты переносили в соответствующие каналы для считывания сигнала флуоресценции.

6.2. Специфическое связывание ADC на основе SYJS001 с CLDN18.2

Клетки HEK293-CLDN18.2 культивировали, используя надлежащую полную среду и осуществляли пассажи каждые 2-3 суток. Когда степень слияния клеток достигала 90%, клеточную суспензию с плотностью клеток, подведенной полной средой до $2-3 \times 10^6$ клеток/мл, высевали в проточные 96-луночные используемые в анализе планшеты, применяя многоканальную пипетку, в количестве по 100 мкл на одну лунку. Планшеты центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Планшеты дважды промывали смесью 2% FBS/PBS. Моноклональное антитело SYJS001 и ADC на основе SYJS001 разбавляли буфером на основе 2% FBS/PBS. Разведение ADC на основе SYJS001 осуществляли в градиентном 3-кратном отношении, начиная с концентрации 15 мкг/мл, с получением 11 концентраций. Готовили по два экземпляра для каждой концентрации и соответствующий пустой контроль. Из расчета на одну лунку добавляли по 100 мкл раствора антитела в каждом разведении и планшеты инкубировали при 4°C в течение 2 ч. После трехкратной промывки планшетов смесью 2% FBS/PBS, добавляли 488-меченное козье антитело к IgG человека (в разведении 1:1000) и планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшетов смесью 2% FBS/PBS планшеты переносили в соответствующие каналы для считывания сигнала флуоресценции.

Результаты показали (см. ФИГ. 9 и 10), что моноклональное антитело SYJS001, полученное в настоящей заявке, обладает способностью специфически связываться с CLDN18.2 без значительного перекрестного взаимодействия с CLDN18.1. ADC на основе SYJS001 также специфически связывался с CLDN18.2 по сравнению с «голым» антителом. После конъюгирования с токсинами никакого значительного влияния на аффинность антитела обнаружено не было.

Пример 7. Эксперимент по подтверждению эндоцитоза ADC на основе

SYJS001

Методики эксперимента

Клетки HEK293-CLDN18.2 собирали и ресуспендировали, используя полную среду DMEM. Клетки ресуспендировали несколько раз путем осторожного продувания для получения суспензии отдельных клеток. Жизнеспособность клеток и количество клеток определяли, применяя способ окрашивания трипановым синим. В каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток, применимого для конфокального микроскопа, добавляли по 100 мкл клеточной суспензии с плотностью клеток, подведенной до 1×10^5 клеток/мл. Число клеток на одну лунку составляло 1×10^4 . Антитело SYJS001, меченное Zenon™ pHrodo™ iFL, добавляли в 96-луночный планшет в конечной концентрации 2 мкг/мл и затем планшет непрерывно инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 24 часов. Все изображения были обнаружены и получали с помощью лазерного конфокального микроскопа, оснащенного объективом с 20-кратным увеличением.

Приведенные на ФИГ. 11 результаты показали, что ADC на основе SYJS001 подвергался эндоцитозу клетками HEK293-CLDN18.2 и локализовывался в кислой среде лизосом (реагенты для мечения IgG Zenon™ pHrdo™ iFL (Z25611) от Invitrogen генерировали флуоресценцию только в кислой среде лизосом. Например, области, заключенные в три прямоугольника на крайней справа панели (HEK293-CLDN18.2) на ФИГ. 11, показали точки зеленой флуоресценции под зеркалом), в то время как в клетках HEK293 и HEK293-CLDN18.1 эндоцитоз не происходил и ни одной точки зеленой флуоресценции не наблюдалось.

Пример 8. Ингибирование роста различных клеток «голым» антителом SYJS001 и ADC

Методики эксперимента: клетки собирали для ресуспендирования с целью получения суспензий отдельных клеток. Жизнеспособность клеток и количество клеток определяли, применяя способ окрашивания трипановым синим. В каждую лунку 96-луночного черного планшета для культивирования клеток с лунками с плоским дном добавляли по 100 мкл клеточной суспензии с плотностью клеток, подведенной до 1×10^5 клеток/мл. В 96-луночные черные планшеты для культивирования клеток с лунками с плоским дном добавляли по 20 мкл разбавленных тестируемых образцов из расчета на одну лунку. Планшеты инкубировали в течение 66 ± 3 ч в камере для культивирования клеток (37°C, 5% CO₂). В каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора натриевой соли

резазурина (0,03% масс./об.) и планшеты инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C. Значения сигнала флуоресценции считывали с помощью микропланшетного ридера при 550 нм/610 нм и строили кривую, используя программное обеспечение Magellan6 или аналогичное программное обеспечение для построения кривых, с целью получения значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для референсного стандарта и тестируемых образцов. Выходным параметром для C является IC₅₀ в нг/мл.

Как показано на ФИГ. 12-17 и в Таблице 4, ADC на основе SYJS001 ингибировал рост раковых клеток NCI-N87-CLDN18.2 (линия клеток рака желудка), КАТОIII (линия клеток рака желудка), NCI-H460-CLDN18.2 (линия клеток рака легкого), NUGC4-CLDN18.2 (линия клеток рака желудка), PATU8988S (линия клеток рака поджелудочной железы) и ВхРС-3-CLDN18.2 (линия клеток рака поджелудочной железы) *in vitro*.

Таблица 4. Ингибирование пролиферации различных клеток *in vitro* под действием «голового» антитела SYJS001 и ADC на основе SYJS001 (примечание: N/A означает «отсутствие эффекта ингибирования»)

| Соединение | IC ₅₀ (нг/мл) | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------|----------------|-------------------|----------------|--------------|-----------------|
| | NCI-N87-CLDN18.2 | КАТОIII | NCI-H460-CLDN18.2 | NUGC4-CLDN18.2 | PATU8988S | ВхРС-3-CLDN18.2 |
| ADC на основе SYJS001 | 7,04±2,67 | 60526±11976,97 | 456,94±24,70 | 228,07±43,95 | 769220±11512 | 28,03±0,89 |
| Моно-клональное антитело SYJS001 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

Как показано выше, ADC на основе SYJS001 оказывал значительный ингибирующий эффект на клетки рака желудка, клетки рака легкого и клетки рака поджелудочной железы, которые сверхэкспрессировали CLDN18.2, и оказывал слабый ингибирующий эффект на клетки рака желудка человека КАТОIII и клетки рака поджелудочной железы человека PATU8988S, которые не экспрессировали или в недостаточной мере экспрессировали CLDN18.2.

Пример 9. Оценка эффективности ADC на основе SYJS001 *in vivo*

9.1. Эффективность по сравнению с гемцитабином и цисплатином в качестве референсов

1) В этом эксперименте использовали бестимусных мышей с ксенотрансплантатами Vхрс3-18.2 рака поджелудочной железы человека. Когда объем опухолей достигал примерно 100 мм^3 (через 39 суток после инокуляции), отбирали 48 животных с массивными ксенотрансплантатами и подразделяли на шесть групп (на 0 сутки), при этом среди групп объем опухолей был распределен равномерно. Восьми животным в каждой из групп внутривенно вводили: 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций (0,9% INJ NS, контрольная группа с введением разбавителя), SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), SYJS001-mAb («голое» антитело SYJS001) в дозе 8 мг/кг (разовой дозе) и гемцитабин (GEM) в дозе 50 мг/кг (2х/нед×4, два раза в неделю в течение 4 недель), соответственно. Диаметры опухолей измеряли два раза в неделю. Мышей взвешивали и данные регистрировали. Рост опухолей наблюдали в динамике, измеряя диаметры опухолей в разные моменты времени после введения дозы. В конце эксперимента на 28 сутки у мышей вызывали асфикцию двуокисью углерода и выполняли отделение и взвешивание опухолей.

В этом эксперименте получали следующие результаты. Степени подавления увеличения массы опухолей составляли 56,6%, 94,8%, 97,8%, -36,2%, 51,0% в группах с SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), в группе с SYJS001-mAb в дозе 8 мг/кг (разовой дозе) и в группе с гемцитабином в дозе 50 мг/кг (2х/нед.×4), соответственно. SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) и GEM в дозе 50 мг/кг (2х/нед.×4: два раза в неделю, в общей сложности четыре дозы) значительно подавляли рост опухолей по сравнению с контрольной группой с введением разбавителя (0,9% раствора хлорида натрия для инъекций) ($p < 0,01$). Подавление роста опухоли оказалось более выраженным в группах с SYJS001-ADC в дозе 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), чем в группе положительного контроля - группе с GEM в дозе 50 мг/кг (2х/нед.×4). В частности, в группе с SYJS001-ADC в дозе 8 мг/кг степени подавления были выше почти в 2 раза ($p < 0,001$) (см. ФИГ. 18).

2) В этом эксперименте использовали бестимусных мышей с ксенотрансплантатами NUGC-4-18.2 рака желудка человека. Когда объем опухолей достигал примерно 120 мм^3 (через 6 суток после инокуляции), отбирали 64 животных с массивными ксенотрансплантатами и подразделяли на восемь групп (на 0 сутки), при этом среди групп объем опухолей был распределен равномерно. Восьми животным в каждой из групп внутривенно вводили: 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций (0,9% INJ NS, контрольная группа с введением разбавителя), SYJS001-ADC в дозе 1, 2 и 4 мг/кг

(1х/нед.×3), SYJS001-ADC в дозе 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг (1х/нед.×3) и цисплатин в дозе 6 мг/кг (1х/нед.×3, один раз в неделю в течение 3 недель), соответственно. Диаметры опухолей измеряли два раза в неделю. Мышей взвешивали и данные регистрировали. Рост опухолей наблюдали в динамике, измеряя диаметры опухолей в разные моменты времени после введения дозы. В конце эксперимента на 20 сутки у мышей вызывали асфикцию двуокисью углерода и выполняли отделение и взвешивание опухолей.

В этом эксперименте получали следующие результаты. Степени подавления увеличения массы опухолей составляли 98,0%, 100%, 100%, 100%, 100%, -1,2%, 66,5% в группах с SYJS001-ADC в дозе 1, 2 и 4 мг/кг (1х/нед.×3), с SYJS001-ADC в дозе 4, 8 мг/кг (разовой дозе), с SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг (1х/нед.×3) и с цисплатином в дозе 6 мг/кг (1х/нед.×3), соответственно. По сравнению с контрольной группой с введением разбавителя рост опухолей значительно подавлялся во всех протестированных группах ($p < 0,001$) за исключением группы с SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг (1х/нед.×3). Группа с SYJS001-ADC в дозе 1, 2 и 4 мг/кг (1х/нед.×3) и группа с SYJS001-ADC в дозе 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) показывали значительное преимущество по отношению к группе положительного контроля - группе с цисплатином в дозе 6 мг/кг (1х/нед.×3) с точки зрения эффективности и токсичности ($p < 0,05$) (см. ФИГ. 19).

9.2. Эффективность по сравнению с IMAB362-ADC в качестве эталона

IMAB362 (также известный как клаудиксимаб или золбетуксимаб) представляет собой известное химерное моноклональное антитело IgG1 подтипа, которое избирательно нацелено на первый внеклеточный домен CLDN18.2 и обладает незначительной активностью в отношении CLDN18.1. В этом эксперименте IMAB362 было выбрано в качестве референсного антитела.

1) В данном эксперименте использовали бестимусных мышей с ксенотрансплантатами Vхрс3-18.2 рака поджелудочной железы человека. Когда объем опухолей достигал примерно 100 мм³ (через 39 суток после инокуляции), отбирали 64 животных с массивными ксенотрансплантатами и подразделяли на восемь групп (на 0 сутки), при этом среди групп объем опухолей был распределен равномерно. Восемью животным в каждой из групп внутривенно вводили: 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций (0,9% INJ NS, контрольная группа с введением разбавителя), SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), IMAB362-ADC (последовательность IMAB362 взята из CN201680021997.6. Синтез гена был выполнен в Nanjing GenScript Biotechnology Co.,

Ltd. Экспрессию белка осуществляли посредством временной экспрессии, используя систему KOP293 для экспрессии белков после временной трансфекции от Kailui Biotechnology Co., Ltd. из Чжухая (Zhuhai) (подробное описание стадий см. на веб-сайте). IMAB362-ADC получали в соответствии со способом, приведенным в примере 3 раздела «Способ получения ADC на основе SYJS001») в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) и SYJS001-mAb в дозе 8 мг/кг (разовой дозе), соответственно. Диаметры опухолей измеряли два раза в неделю. Мышей взвешивали и данные регистрировали. Рост опухолей наблюдали в динамике, измеряя диаметры опухолей в разные моменты времени после введения дозы. В конце эксперимента на 28 сутки у мышей вызывали асфикцию двуокисью углерода и выполняли отделение и взвешивание опухолей.

В этом эксперименте получали следующие результаты. В том случае, когда объем опухолей в контрольной группе с введением разбавителя взят за 100%, выраженные в процентном отношении объемы опухолей в группах с SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе), SYJS001-mAb в дозе 8 мг/кг (разовой дозе) и IMAB362-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) составляли 35,9%, 6,0%, 3,4%, 116,2%, 47,0%, 6,8% и 5,1%, соответственно. SYJS001-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) и IMAB362-ADC в дозе 2, 4 и 8 мг/кг (разовой дозе) значительно подавляли рост опухолей по сравнению с контрольной группой с введением разбавителя ($p < 0,01$). При сравнении SYJS001-ADC с ADC на основе положительного эталона IMAB362 (IMAB362-ADC) их эффекты оказались сопоставимы в высокой дозе, однако в случае низкой дозы (начальной дозы) противоопухолевый эффект *in vivo* у ADC на основе SYJS001 значительно превосходил таковой у IMAB362-ADC. Данные по относительному объему опухолей (RTV) см. на ФИГ. 20.

Согласно данным, опубликованным Chunze Li в 2019 г. (Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody-drug conjugates in cancer patients: learning from eight first-in-human Phase 1 studies, 2019, vol. 12, № 1, MABS), ADC на основе VC-MMAE обычно вводят в диапазоне клинических доз 0,1-3,2 мг. Следовательно, низкая доза, полученная в данном эксперименте, является более перспективной с точки зрения клинического применения, и поэтому клинические перспективы и разработка лекарственного средства в виде SYJS001-ADC превосходят таковые в случае IMAB362-ADC.

2) В этом эксперименте использовали бестимусных мышей с ксенотрансплантатами NUGC-4-18.2 рака желудка человека. Когда объем опухолей достигал примерно 120 мм³ (через 6 суток после инокуляции), отбирали 64 животных с

массивными ксенотрансплантатами и подразделяли на восемь групп (на 0 сутки), при этом среди групп объем опухолей был распределен равномерно. Восемью животным в каждой из групп внутривенно вводили: 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций (0,9% INJ NS, контрольная группа с введением разбавителя), SYJS001-ADC в дозе 0,5, 1, 2 и 4 мг/кг (разовой дозе), IMAB362-ADC в дозе 0,5, 1, 2 и 4 мг/кг (разовой дозе) и SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг (разовой дозе), соответственно. Диаметры опухолей измеряли два раза в неделю. Мышей взвешивали и данные регистрировали. Рост опухолей наблюдали в динамике, измеряя диаметры опухолей в разные моменты времени после введения дозы. В конце эксперимента на 20 сутки у мышей вызывали асфикцию двуокисью углерода и выполняли отделение и взвешивание опухолей.

В этом эксперименте получали следующие результаты. В том случае, когда объем опухолей в контрольной группе с введением разбавителя взят за 100%, выраженные в процентном отношении объемы опухолей в группах с SYJS001-ADC в дозе 0,5, 1, 2 и 4 мг/кг (разовой дозе), IMAB362-ADC в дозе 0,5, 1, 2 и 4 мг/кг (разовой дозе) и SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг (разовой дозе) составляли 59,1%, 27,3%, 1,8%, 0%, 68,2%, 30%, 1,8%, 0% и 83,8%, соответственно. По сравнению с контрольной группой с введением разбавителя рост опухолей значительно подавлялся во всех протестированных группах за исключением группы с SYJS001-mAb в дозе 4 мг/кг ($p < 0,001$). При сравнении противоопухолевого эффекта *in vivo* SYJS001-ADC и IMAB362-ADC в отношении NUGC-4-18.2 их эффекты оказались сопоставимы в высокой дозе, однако в случае низкой дозы (начальной дозы) противоопухолевый эффект *in vivo* у ADC на основе SYJS001 значительно превосходил таковой у IMAB362-ADC. См. ФИГ. 21.

Аналогично предыдущему сравнительному эксперименту, низкая доза, полученная в данном эксперименте, является более перспективной с точки зрения клинического применения, и поэтому клинические перспективы и разработка лекарственного средства в виде SYJS001-ADC превосходят таковые в случае IMAB362-ADC.

Пример 10. Тестирование высвобождения ММАЕ и эффекта «свидетеля»

После 4 суток совместного культивирования клеток положительной группы ВхРС-3-CLDN18.2 и клеток НЕК293-Luc (клеток, не экспрессирующих CLDN18.2) с ADC на основе SYJS001 определяли количество клеток НЕК293-Luc в смеси клеток по развитию хемилюминесценции. По сравнению с группой отрицательных клеток, т.е. совместно культивируемой группой клеток ВхРС-3 и НЕК293-Luc, в случае трех

концентраций, включая 5 мкг/мл, 1 мкг/мл и 200 нг/мл, были обнаружены способность вызывать ингибирование пролиферации клеток НЕК293-Luc в различной степени. Это указывало на то, что антитело SYJS001 обладало способностью связываться с клетками ADC-положительной группы ВхРС-3-CLDN18.2 человека и затем проникать в клетки посредством эндоцитоза. MMAE, высвободившийся в клетках, обладал способностью приводить к апоптозу клеток ВхРС-3-CLDN18.2 человека. MMAE, высвободившийся после апоптоза и лизиса клеток обладал способностью вызывать ингибирование роста клеток-свидетелей, как показано на ФИГ. 22. Таким образом, MMAE может эффективно высвободиться из ADC на основе SYJS001 и оказывать цитотоксическое действие на соседние клетки благодаря своему проникновению через мембрану, демонстрируя эффект свидетеля.

Принимая во внимание результаты приведенных выше многочисленных примеров, можно видеть, что моноклональное антитело к CLDN18.2, полученное в настоящей заявке, специфически связывается с CLDN18.2-положительными клетками, что приводит к высокоэффективной интернализации. Лекарственное средство в форме ADC, полученное в настоящей заявке, обладает очень сильным эффектом уничтожения опухолевых клеток, представленных клетками рака поджелудочной железы, рака желудка и рака легкого.

Пример 11. Оценка стабильности ADC

11.1. Тестирование стабильности в плазме и сыворотке крови

Цель этого экспериментального исследования заключалась в изучении *in vitro* метаболической стабильности SYJS001-ADC в плазме и сыворотке крови от разных видов (человека, яванского макака и крысы Sprague Dawley (SD)). SYJS001-ADC инкубировали в концентрации 100 мкг/мл в течение 0-168 ч (7 суток) при 37°C в стерильных условиях. Концентрацию MMAE в смеси 0,5% BSA-PBS, плазме крови человека, плазме крови яванского макака и плазме крови крысы SD измеряли с применением метода жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Результаты показаны в Таблицах 5-8. С увеличением времени инкубации во всех образцах были обнаружены образование свободного MMAE. После инкубации SYJS001-ADC в течение 168 ч (7 суток) при 37°C выраженные в процентном отношении значения высвобождения в смеси 0,5% BSA-PBS, плазме крови человека, плазме крови яванского макака и плазме крови крысы SD составляли 0,672%, 0,327%, 0,209% и 0,405%, соответственно. Эксперимент показал, что SYJS001-ADC

характеризуется степенью высвобождения MMAE, составляющей меньше 1,0%, что указывает на относительную стабильность SYJS001-ADC в смеси 0,5% BSA-PBS, плазме крови человека, плазме крови яванского макака и плазме крови крысы SD.

Таблица 5. Концентрация свободного MMAE и степень высвобождения из ADC в 0,5% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS

| | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | | | Среднее значение | Стандартное отклонение | Степень высвобождения (%) |
|-----------------|--------------|----------------------|-------|-------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| 0,5% BSA-PBS | 0 | 0,167 | 0,179 | 0,154 | 0,167 | 0,013 | 0,017 |
| | 8 | 0,662 | 0,635 | 0,682 | 0,660 | 0,024 | 0,069 |
| | 24 | 1,687 | 1,791 | 1,711 | 1,730 | 0,054 | 0,181 |
| | 48 | 2,808 | 2,732 | 2,871 | 2,804 | 0,070 | 0,293 |
| | 72 | 3,485 | 3,536 | 3,457 | 3,493 | 0,040 | 0,365 |
| | 96 | 4,532 | 4,446 | 4,238 | 4,405 | 0,151 | 0,460 |
| | 168 | 5,51 | 6,846 | 6,951 | 6,436 | 0,803 | 0,672 |

Таблица 6. Концентрация свободного MMAE и степень высвобождения из ADC в плазме крови человека

| | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | | | Среднее значение | Стандартное отклонение | Степень высвобождения (%) |
|-----------------------------|--------------|----------------------|-------|-------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| Плазма крови человека | 0 | BQL | BQL | BQL | BQL | NA | NA |
| | 8 | 0,105 | 0,106 | 0,097 | 0,103 | 0,005 | 0,011 |
| | 24 | 0,39 | 0,33 | 0,31 | 0,343 | 0,042 | 0,036 |
| | 48 | 0,695 | 0,713 | 0,631 | 0,680 | 0,043 | 0,071 |
| | 72 | 1,05 | 1,045 | 0,932 | 1,009 | 0,067 | 0,105 |
| | 96 | 1,398 | 1,34 | 1,193 | 1,310 | 0,106 | 0,137 |
| | 168 | 3,017 | 3,122 | 3,238 | 3,126 | 0,111 | 0,327 |

BQL (от англ. below limit of quantification) означает «ниже предела количественного определения».

NA означает «данные не приведены».

Таблица 7. Концентрация свободного MMAE и степень высвобождения из ADC в плазме крови обезьяны

| | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | | | Среднее значение | Стандартное отклонение | Степень высвобождения (%) |
|-----------------------------|--------------|----------------------|-------|-------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| | 0 | BQL | BQL | BQL | BQL | NA | NA |
| Плазма крови обезьяны | 8 | 0,118 | 0,137 | 0,138 | 0,131 | 0,011 | 0,014 |
| | 24 | 0,304 | 0,25 | 0,299 | 0,284 | 0,030 | 0,030 |
| | 48 | 0,549 | 0,556 | 0,543 | 0,549 | 0,007 | 0,057 |
| | 72 | 0,773 | 0,773 | 0,671 | 0,739 | 0,059 | 0,077 |
| | 96 | 1,042 | 0,971 | 0,978 | 0,997 | 0,039 | 0,104 |
| | 168 | 1,97 | 2,05 | 1,983 | 2,001 | 0,043 | 0,209 |

Таблица 8. Концентрация свободного MMAE и степень высвобождения из ADC в плазме крови крысы

| | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | | | Среднее значение | Стандартное отклонение | Степень высвобождения (%) |
|--------------------------|--------------|----------------------|-------|-------|---------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | |
| | 0 | BQL | BQL | BQL | BQL | NA | NA |
| Плазма крови крысы | 8 | 0,24 | 0,217 | 0,2 | 0,219 | 0,020 | 0,023 |
| | 24 | 0,565 | 0,537 | 0,532 | 0,545 | 0,018 | 0,057 |
| | 48 | 1,064 | 1,002 | 1,042 | 1,036 | 0,031 | 0,108 |
| | 72 | 1,498 | 1,393 | 1,538 | 1,476 | 0,075 | 0,154 |
| | 96 | 2,09 | 2,009 | 1,883 | 1,994 | 0,104 | 0,208 |
| | 168 | 4,041 | 3,801 | 3,793 | 3,878 | 0,141 | 0,405 |

11.2. Тестирование стабильности в условиях «ускоренного старения»

SYJS001-ADC хранили в буфере (5% (масс./об.) L-гистидина и 25% (масс./об.) гидрохлорида L-гистидина) при температуре от 2°C до 8°C в течение разных периодов времени и проводили тестирование стабильности. Результаты показаны в приведенной далее таблице. В случае IMAB362-ADC (IMAB362-vc-MMAE) на 28 сутки обнаруживали 0,3% свободного токсина (см. Таблицу 7 в CN 107667118A), что намного превышало 0,000026%, т.е. процентное содержание свободного токсина, выделившегося из SYJS001-

ADC в соответствии с настоящей заявкой после хранения в течение 3 месяцев, и это указывало на намного большую стабильность SYJS001-ADC по сравнению с IMAB362-ADC.

Таблица 9. Результаты тестирования стабильности SYJS001-ADC в условиях «ускоренного старения» (6°C±2°C)

| Пункт | Время (месяцы) хранения SYJS001-ADC | | | |
|-------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 месяцев | 1 месяц | 2 месяца | 3 месяца |
| Распределение DAR | DAR: 2,01 | 2,01 | 2,00 | 2,00 |
| DAR2 | 76,80% | 77,83% | 78,50% | 77,29% |
| Свободный MMAE | 0,000012% | 0,000018% | 0,000020% | 0,000026% |
| Свободные L&D | <0,004% | <0,004% | <0,004% | <0,004% |

Пример 12. Сравнительное исследование SYJS001 и IMAB362

12.1. Аффинность

CLDN18.2-сверхэкспрессирующие клетки линии VxPC3-CLDN18.2 ресуспендировали в PBS-буфере и добавляли в 96-луночные планшеты для культивирования с V-образными лунками из расчета на одну лунку по 100 мкл клеточной суспензии с плотностью клеток, подведенной до 1×10^6 клеток/мл. Планшеты центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Тестируемые образцы в исходной концентрации 40 мкг/мл разбавляли буфером для эксперимента в градиентном 5-кратном отношении с получением 10 концентраций. В 96-луночные планшеты с V-образными лунками добавляли из расчета на одну лунку по 100 мкл разведенных тестируемых образцов и планшеты инкубировали при 4°C в течение 60-90 минут. По окончании инкубации планшеты помещали в центрифугу и центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин. После центрифугирования супернатант осторожно вытряхивали, клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS-буфера и центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин. Эти операции повторяли дважды. После центрифугирования супернатант осторожно вытряхивали, добавляли флуоресцентный реагент для детектирования антител (в разведении 1:1000) в соответствии с планом эксперимента и планшеты инкубировали при 4°C в течение 30-60

минут в темноте. По окончании инкубации планшеты помещали в высокоскоростную центрифугу и центрифугировали при 2500 об./мин в течение 5 мин. После центрифугирования супернатант осторожно вытряхивали, клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для анализа и затем выполняли детектирование методом проточной цитометрии, используя планшетный ридер для считывания значений сигнала флуоресценции в соответствующих лунках используемого в анализе планшета. Полученные экспериментальные данные анализировали, применяя программное обеспечение GraphPad Prism 5. Для аппроксимации «S»-кривой выбирали регрессионную модель в виде четырехпараметрического уравнения, и это программное обеспечение автоматически выдавало полуэффективную дозу (ED_{50}) (значение C). Результаты показаны ниже (ФИГ. 23, MFI: средняя интенсивность флуоресценции). Аффинность SYJS001 более чем в два раза превосходит таковую IMAB362.

12.2. Характеристика эпитопов

Конкуренцию между эпитопами для SYJS001-ADC и IMAB362-ADC детектировали с применением системы Octet® для сравнения пар эпитопов. Белок CLDN18.2 человека (5 мкг/мл) использовали для нанесения покрытия на сенсоры захвата HIS1K и загрузку осуществляли в течение 180 с. Эти два антитела разбавляли до концентрации 100 нМ, соответственно, и сенсоры с покрытием сначала оставляли связываться с одним из антител (Ассоциация) в течение 180 с, а затем со вторым антителом (Ассоциация) в течение 180 с. Сигнал связывания со вторым антителом детектировали, чтобы определить, распознают ли эти два антитела один и тот же эпитоп. Результаты: 60%-100% означает абсолютное отсутствие конкуренции; 20%-60% означает частичную конкуренцию; а <20% соответствует случаю полной конкуренции, т.е. когда два антитела считались конкурентными. Результаты показаны в приведенной ниже таблице (Таблице 10), при этом SYJS001-ADC и IMAB362-ADC имели полностью конкурентные эпитопы.

Таблица 10

| | SYJS001 | IMAB362 |
|---------|---------|---------|
| SYJS001 | 9,02% | 7,98% |
| IMAB362 | 7,88% | 6,6% |

12.3. Детекция эндоцитоза

Клетки VxPC3-CLDN18.2 высевали в 6-луночные планшеты в количестве

приблизительно $4-6 \times 10^5$ клеток на одну лунку. Планшеты помещали в инкубатор и инкубировали в течение ночи при 37°C и $5\% \text{CO}_2$. Антитело разбавляли до концентрации 5 мкг/мл полной средой (DMEM (Hyclone, № по каталогу SH30243.01) + $10\% \text{FBS}$ (Gibco, № по каталогу 10091-148) + пуромицин в концентрации 1 мкг/мл (Gibco, № по каталогу A11138-02)). Оставшуюся в 6-луночных планшетах среду отбрасывали и в каждую лунку добавляли по 2 мл полной среды, содержащей антитело. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 4°C и супернатант отбрасывали. Планшеты дважды промывали полной средой. В каждую лунку добавляли по 2 мл не содержащей антител полной среды. В этот момент времени отбирали лунки в 2-3 повторах для проведения трипсинизации, чтобы определить общее количество антител, связавшихся с клетками. Оставшиеся клетки переносили в инкубатор и оставляли для осуществления эндоцитоза на 4 ч , 21 ч , 25 ч и 48 ч при 37°C в инкубаторе с $5\% \text{CO}_2$. После промывки клеток, подвергнутых трипсинизации, в каждый контрольный момент времени добавляли флуоресцентный реагент для детектирования антител (в разведении $1:1000$) и планшеты инкубировали при 4°C в течение 60 минут в темноте. После центрифугирования супернатант осторожно сливали. После двукратной промывки планшетов выполняли определение значения сигнала флуоресценции методом проточной цитометрии.

Степень эндоцитоза = $[(\text{общий сигнал флуоресценции антител} - \text{сигнал флуоресценции в разные моменты времени}) / (\text{общий сигнал флуоресценции антител})] \times 100\%$. Результаты показаны ниже (ФИГ. 24, MFI: средняя интенсивность флуоресценции). Степень эндоцитоза SYJS001 на ранней стадии ($0-21 \text{ ч}$) значительно превышала таковую в случае IMAB362-ADC. В интервале $21-48 \text{ ч}$ степень эндоцитоза SYJS001 по существу соответствовала таковой в случае IMAB362-ADC. В одних и тех же условиях более высокая степень эндоцитоза приводит к усилению способности лекарственного средства проникать в опухолевые клетки, благодаря чему молекулы токсина могут высвободиться в большей степени, и объективно достигается эффект более быстрого действия. Поэтому ожидается, что SYJS001 будет действовать быстрее, чем IMAB362-ADC.

12.4. Анализ ингибирования клеточного роста *in vitro*

1. Клеточная модель аденокарциномы

Клетки ВхРС-3-CLDN18.2 собирали и ресуспендировали, используя полную среду (которую использовали в подразделе 12.3 для анализа эндоцитоза). Клетки ресуспендировали несколько раз путем осторожного продувания для получения

суспензии отдельных клеток. Жизнеспособность клеток и количество клеток определяли, применяя способ окрашивания трипановым синим. В каждую лунку 96-луночных черных планшетов с плоским дном для культивирования клеток добавляли по 100 мкл клеточной суспензии с плотностью клеток, подведенной до 1×10^5 клеток/мл. Антитело в исходной концентрации 5 мкг/мл разбавляли в градиентном 2-кратном отношении с получением в общей сложности 11 концентраций. В лунки 96-луночных черных планшетов с плоским дном для культивирования клеток, содержащие засеянные клетки, добавляли из расчета на одну лунку по 20 мкл разбавленных тестируемых образцов. Антитело и клетки совместно культивировали и инкубировали в инкубаторе для клеток (37°C , 5% CO_2) в течение 63-69 ч. После инкубации добавляли из расчета по 20 мкл на одну лунку раствор натриевой соли резазурина (0,03% масс./об.) и планшеты инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C . Значения сигнала флуоресценции считывали с помощью микропланшетного ридера при 550 нм/610 нм и строили кривую, используя программное обеспечение Magellanb или аналогичное программное обеспечение для построения кривых, с целью получения значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для референтного стандарта и тестируемых образцов. Выходным параметром для С является IC_{50} в нг/мл. Результаты показаны ниже (ФИГ. 25, RLU: относительные единицы люминесценции). Ингибирующий эффект воздействия SYJS001-ADC *in vitro* на клетки VxPC-3-CLDN18.2 значительно превосходил таковой в случае IMAB362-ADC.

2. Клеточная модель рака желудка

Клетки NUGC4-CLDN18.2 собирали и ресуспендировали, используя полную среду (которую использовали в подразделе 12.3 для анализа эндоцитоза). Клетки ресуспендировали несколько раз путем осторожного продувания для получения суспензии отдельных клеток. Жизнеспособность клеток и количество клеток определяли, применяя способ окрашивания трипановым синим. В каждую лунку 96-луночных черных планшетов с плоским дном для культивирования клеток добавляли по 100 мкл клеточной суспензии с плотностью клеток, подведенной до 1×10^5 клеток/мл. Антитело в исходной концентрации 5 мкг/мл разбавляли в градиентном 2-кратном отношении с получением в общей сложности 11 концентраций. В лунки 96-луночных черных планшетов с плоским дном для культивирования клеток, содержащие засеянные клетки, добавляли из расчета на одну лунку по 20 мкл разбавленных тестируемых образцов. Антитело и клетки совместно культивировали и инкубировали в инкубаторе

для клеток (37°C, 5% CO₂) в течение 63-69 ч. После инкубации добавляли из расчета по 20 мкл на одну лунку раствор натриевой соли резазурина (0,03% масс./об.) и планшеты инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C. Значения сигнала флуоресценции считывали с помощью микропланшетного ридера при 550 нм/610 нм и строили кривую, используя программное обеспечение Magellan6 или аналогичное программное обеспечение для построения кривых, с целью получения значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для референтного стандарта и тестируемых образцов. Выходным параметром для С является IC₅₀ в нг/мл. Результаты показаны ниже (ФИГ. 25, RLU: относительные единицы люминесценции). Ингибирующий эффект воздействия SYJS001-ADC *in vitro* на клетки NUGC4-CLDN18.2 превосходил (более чем в 2 раза) таковой в случае IMAB362-ADC.

С учетом результатов приведенных выше экспериментов SYJS001-ADC, полученный в настоящей заявке, значительно превосходит контрольный IMAB362-ADC с точки зрения стабильности, аффинности антитела, эффективности эндоцитоза и ингибирования роста опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

Представленное выше описание иллюстрирует главным образом предпочтительные воплощения, которые приведены только в качестве примера и не ограничивают комбинацию признаков, необходимых для реализации на практике настоящей заявки. Подразумевается, что представленные заголовки не ограничивают различные воплощения настоящей заявки. Такие термины, как «содержащий», «охватывающий» и «включающий» не предназначены для ограничения. Кроме того, если не указано иное, отсутствие какого-либо выражающегося числом изменения включает форму множественного числа. Термин «или» означает «и/или». Если в данном описании не определено иное, то все технические и научные термины, использованные в данном описании, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в данное описание посредством ссылки. Различные модификации и варианты способов и композиций, описанных в данной заявке, будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от объема и сущности настоящей заявки. И хотя настоящая заявка описана посредством конкретных предпочтительных воплощений, следует понимать, что испрашиваемая заявка не должна неправомерно ограничиваться этими конкретными воплощениями. Действительно, подразумевается, что различные варианты описанных воплощений для осуществления настоящей заявки, которые будут

очевидны специалистам в релевантной области техники, включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное(ый) с одной или несколькими молекулами лекарственного средства, где указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и указанная тяжелая цепь содержит три определяющих комплементарность участка (CDR), имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и/или указанная легкая цепь содержит три участка CDR, имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно.

2. Конъюгат по п. 1, где антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело, предпочтительно моноклональное антитело, более предпочтительно гуманизированное антитело и наиболее предпочтительно полностью человеческое антитело.

3. Конъюгат по любому из п.п. 1-2, где антитело представляет собой антитело IgG-типа, предпочтительно антитело IgG1-типа.

4. Конъюгат по любому из п.п. 1-3, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab фрагмент, F(ab')₂ фрагмент или одноцепочечный Fv фрагмент (scFv).

5. Конъюгат по любому из п.п. 1-4, где тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и/или легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8.

6. Конъюгат по любому из п.п. 1-5, где тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и/или легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

7. Конъюгат по любому из п.п. 1-6, где молекула лекарственного средства представляет собой противораковое лекарственное средство, такое как цитотоксическое лекарственное средство, иммуностимулятор или радиоактивный изотоп.

8. Конъюгат по п. 7, где цитотоксическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора тубулина, ингибитора ДНК-топоизомеразы, ДНК-повреждающего агента, антиметаболита и противоопухолевого антибиотика.

9. Конъюгат по п. 8, где ингибитор тубулина представляет собой производное ауристинина (например, MMAE (монометилауристин E), MMAF

(монометилауристатин F)) или производное алкалоида майтансина (например, DM1 (N2'-дезацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтансин), DM4 (N2'-дезацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтансин), ансамитоцин, мертанзин или доластатин либо их производное).

10. Конъюгат по п. 8, где ингибитор ДНК-топоизомеразы представляет собой аналог камптотецина, ингибитор ДНК-топоизомеразы I или его производное, например, DXD, SN38, иринотекан, иринотекана гидрохлорид, камптотецин, 9-аминокамптотецин, 9-нитрокамптотецин, 10-гидроксикамптотецин, 9-хлор-10-гидроксикамптотецин, 22-гидроксиакуминатин, топотекан, лертонотекан (lertonotecan), белотекан, икситекан (ixitecan), гомосилатекан, 6,8-дибром-2-метил-3-[2-(D-ксилопиранозиламино)фенил]-4(3H)-хиназолинон, 2-циано-3-(3,4-дигидроксифенил)-N-(фенилметил)-(2E)-2-акриламид, 2-циано-3-(3,4-дигидроксифенил)-N-(3-гидроксифенилпропил)-(E)-2-акриламид, 12-β-D-глюкопиранозил-12,13-дигидро-2,10-дигидрокси-6-[[2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этил]амино]-5H-индолиндоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7(6H)-дион, N-[2-(диметиламино)этил]-4-акридин-формамида дигидрохлорид, N-[2-(диметиламино)этил]-4-акридинкарбоксамид.

11. Конъюгат по п. 8, где ДНК-повреждающий агент выбран из группы, состоящей из калихеамицина, дуокармицина и пирролобензодиазепина.

12. Конъюгат по п. 7, где иммуностимулирующий агент выбран из группы, состоящей из левамизола, пидотимода, имиквимода, изопринозина, комплекса полиинозиновой:полицитидиловой кислот и комплекса полиинозиновой:полиуридилиловой кислот; и/или антиметаболит выбран из группы, состоящей из метотрексата, 6-меркаптопурина и 5-фторурацила; и/или противоопухолевый антибиотик выбран из группы, состоящей из полипептидного антибиотика (такого как актиномицин D или блеомицин) и антрахинона (такого как доксорубин или митоксантрон гидрохлорид).

13. Конъюгат по п. 7, где радиоактивный изотоп выбран из группы, состоящей из ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co и ^{177}Lu .

14. Конъюгат по любому из п.п. 1-13, где молекула лекарственного средства конъюгирована с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера, который соединен с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через сульфгидрильную или аминогруппу.

15. Конъюгат по п. 14, где линкер выбран из группы, состоящей из

малеимидакапроил-валин-цитруллин-*para*-аминобензила (mc-Val-Cit-pAB), mc-Val-Cit-pABC (*-para*-аминобензилоксикарбонил), mc-Val-Cit, NH₂-(PEG)_m-Val-Cit, NH₂-(PEG)_m-Val-Cit-pAB, где m равно целому числу от 1 до 8.

16. Конъюгат по п. 14, имеющий структуру, представленную как Ab-(L-U)_n, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, L представляет собой линкер, U представляет собой молекулу лекарственного средства, и n равно целому числу или десятичному числу от 1 до 8.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из п.п. 1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, предназначенная для применения в лечении или предупреждении рака.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где рак представляет собой CLDN18.2-положительный рак.

20. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 18-19, где рак представляет собой рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи или рак желчного пузыря.

21. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 18-20, где рак представляет собой аденокарциному желудка, пищевода, протока поджелудочной железы, желчного протока, легкого или яичника.

22. Фармацевтическая композиция по любому из п.п. 18-21, где рак представляет собой рак желудка или рак поджелудочной железы.

23. Применение конъюгата по любому из п.п. 1-16 или фармацевтической композиции по п. 17 для изготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения рака.

24. Применение по п. 23, где рак представляет собой CLDN18.2-положительный рак.

25. Применение по п. 23 или 24, где рак представляет собой рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи или рак желчного пузыря.

26. Применение по любому из п.п. 23-25, где рак представляет собой аденокарциному желудка, пищевода, протока поджелудочной железы, желчного протока, легкого или яичника.

27. Применение по любому из п.п. 23-26, где рак представляет собой рак желудка

или рак поджелудочной железы.

28. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из п.п. 1-16 или фармацевтической композиции по п. 17.

29. Способ по п. 28, где рак представляет собой CLDN18.2-положительный ра .

30. Способ по п. 28 или 29, где рак представляет собой рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичника, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи или рак желчного пузыря.

31. Способ по любому из п.п. 28-30, где рак представляет собой аденокарциному желудка, пищевода, протока поджелудочной железы, желчного протока, легкого или яичника.

32. Способ по любому из п.п. 28-31, где рак представляет собой рак желудка или рак поджелудочной железы.

33. Изделие медицинского назначения, содержащее конъюгат по любому из п.п. 1-16 или фармацевтическую композицию по п. 17.

34. Изделие медицинского назначения по п. 33, представляющее собой набор, включающий в себя контейнер, содержащий конъюгат по любому из п.п. 1-16 или фармацевтическую композицию по п. 17.

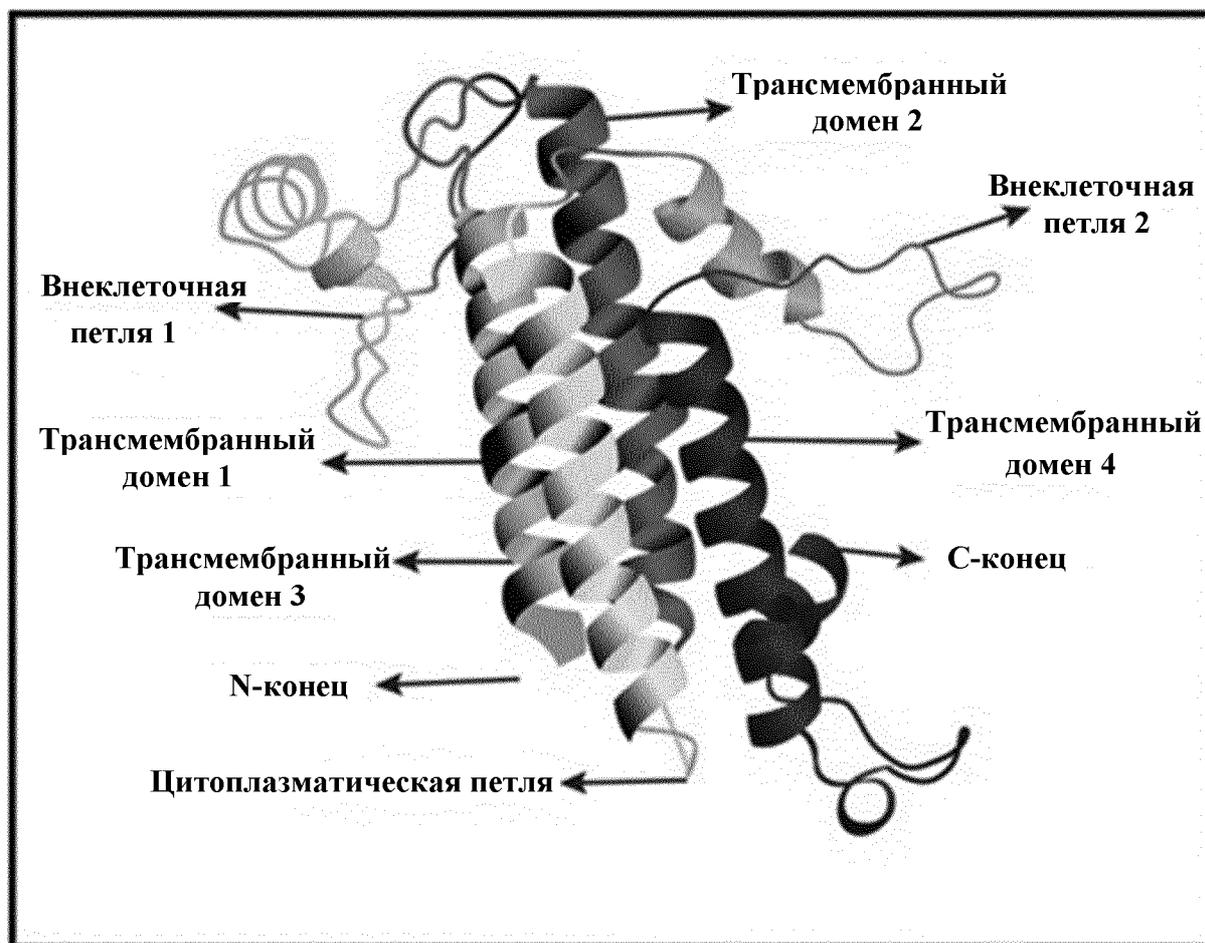
35. Применение конъюгата по любому из п.п. 1-16 и антипролиферативного агента для изготовления лекарственного средства для лечения опухоли.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из п.п. 1-16 и антипролиферативный агент.

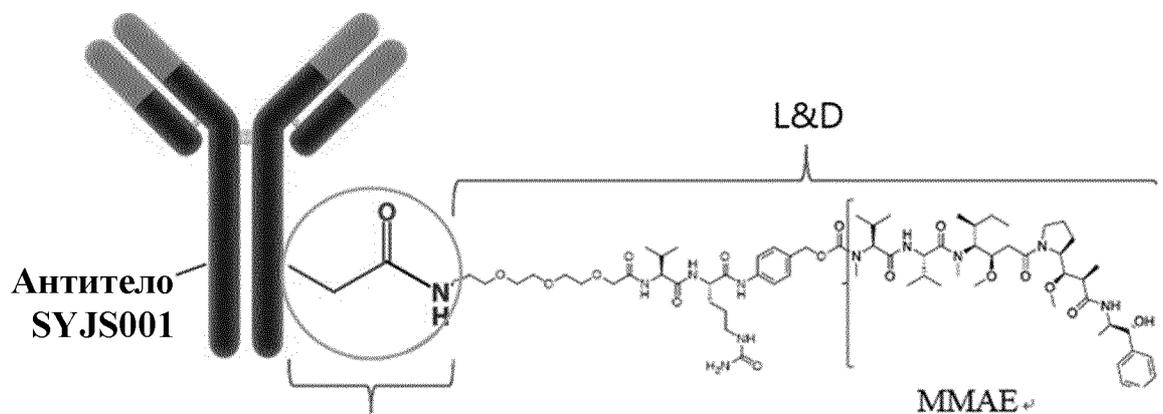
37. Способ лечения опухоли у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из п.п. 1-16 или фармацевтической композиции по п. 17 и антипролиферативного агента.

38. Применение по п. 35, или фармацевтическая композиция по п. 36, или способ по п. 37, где антипролиферативный агент выбран из группы, состоящей из паклитаксела, доксорубина, доцетаксела, цисплатина, карбоплатина и ипроплатина.

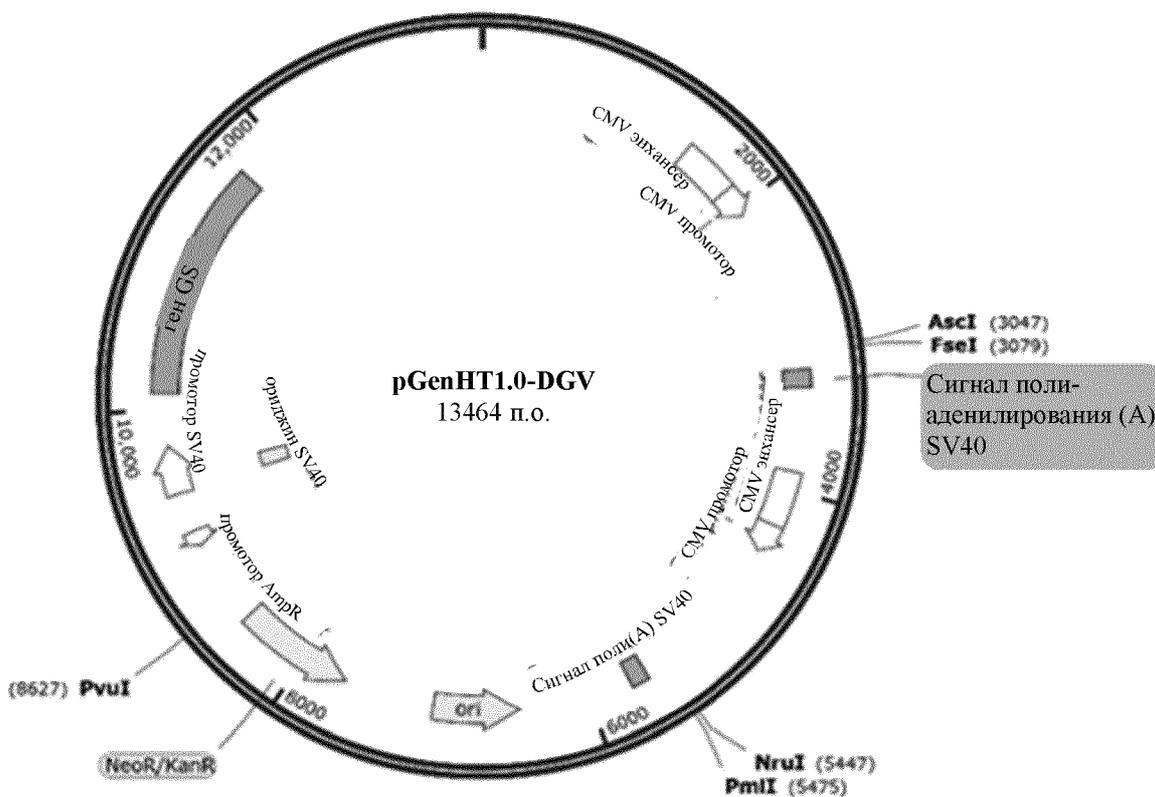
Фиг. 1



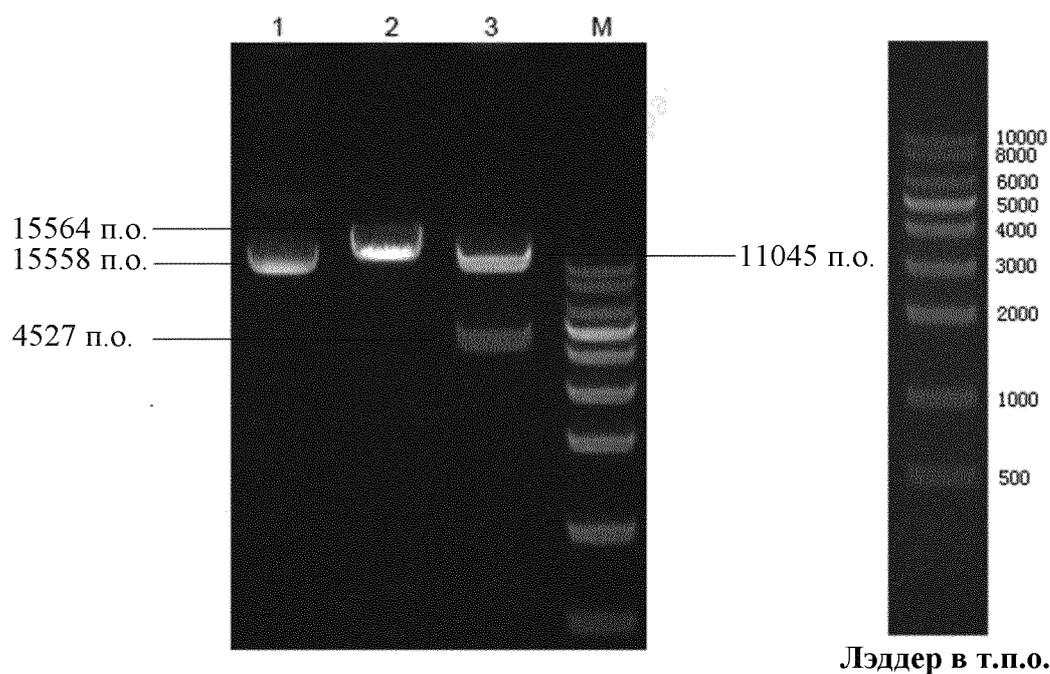
Фиг. 2



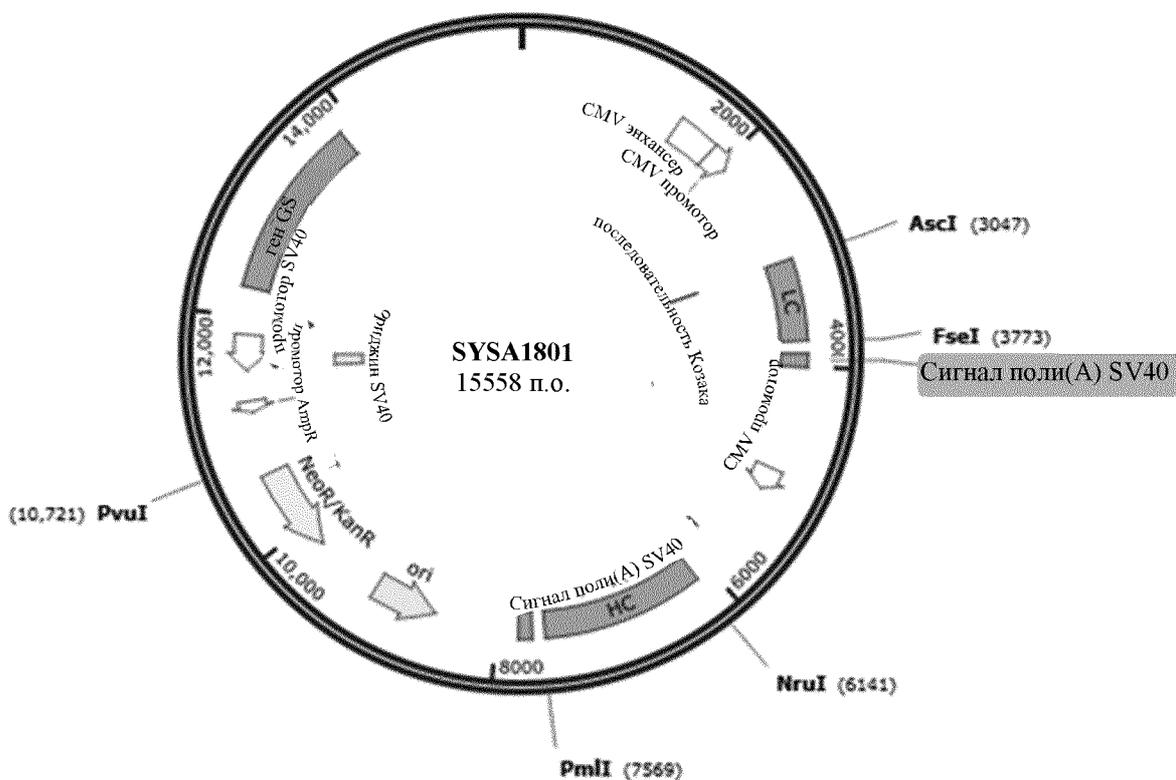
Фиг. 3



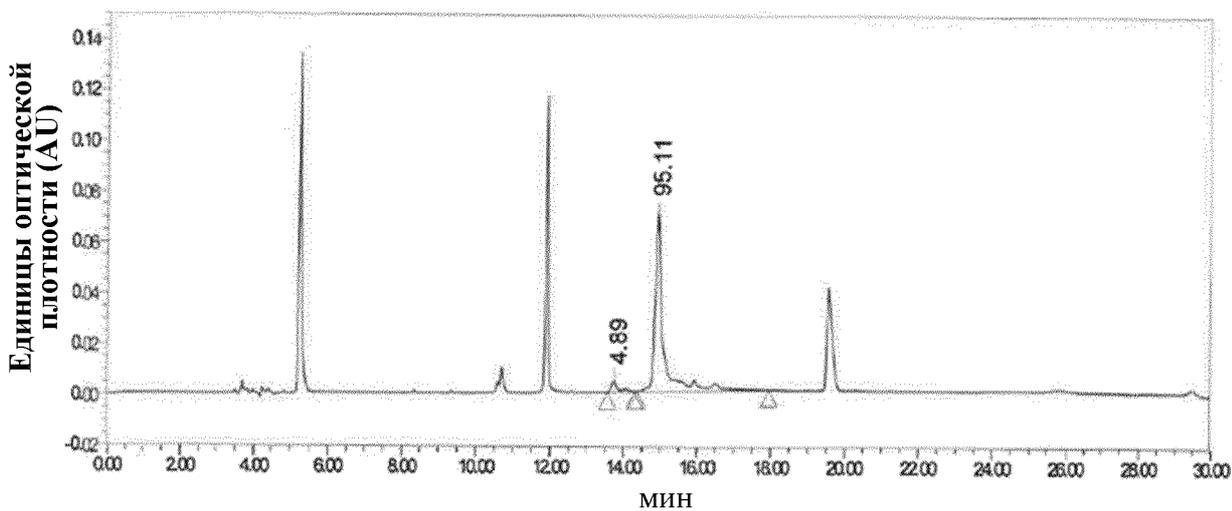
Фиг. 4



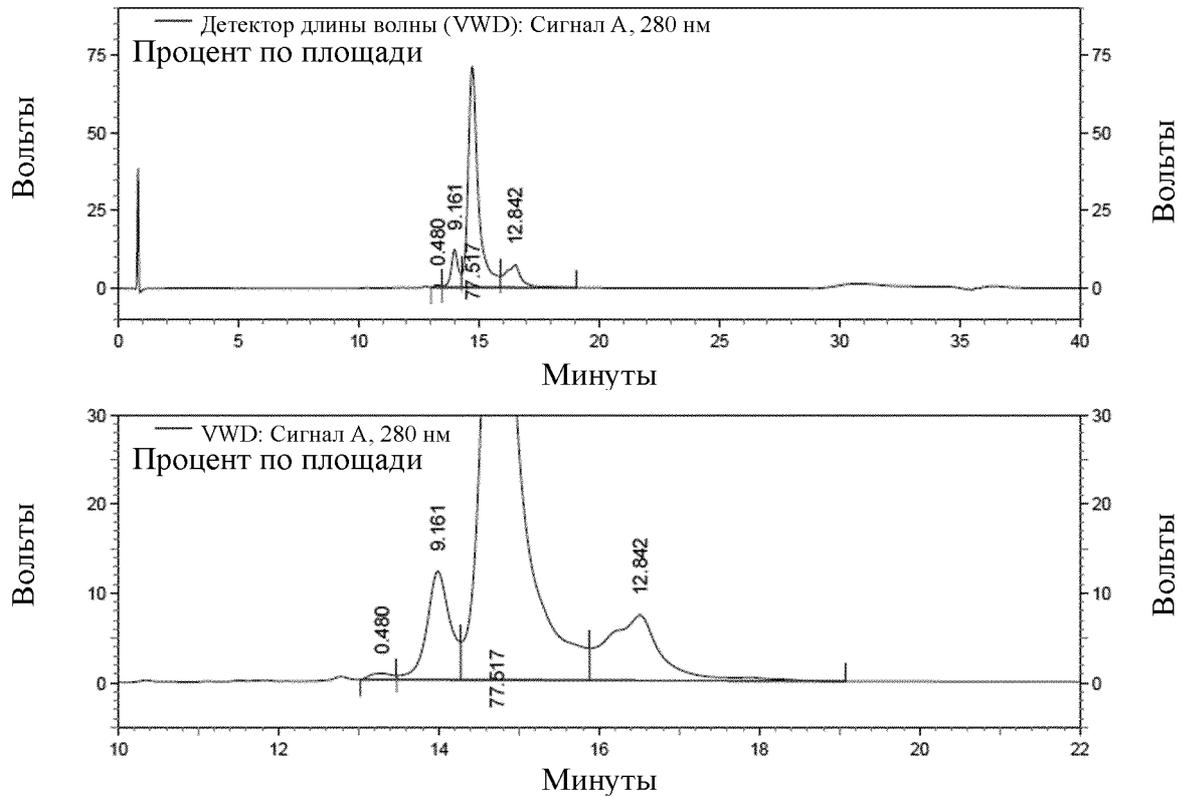
Фиг. 5



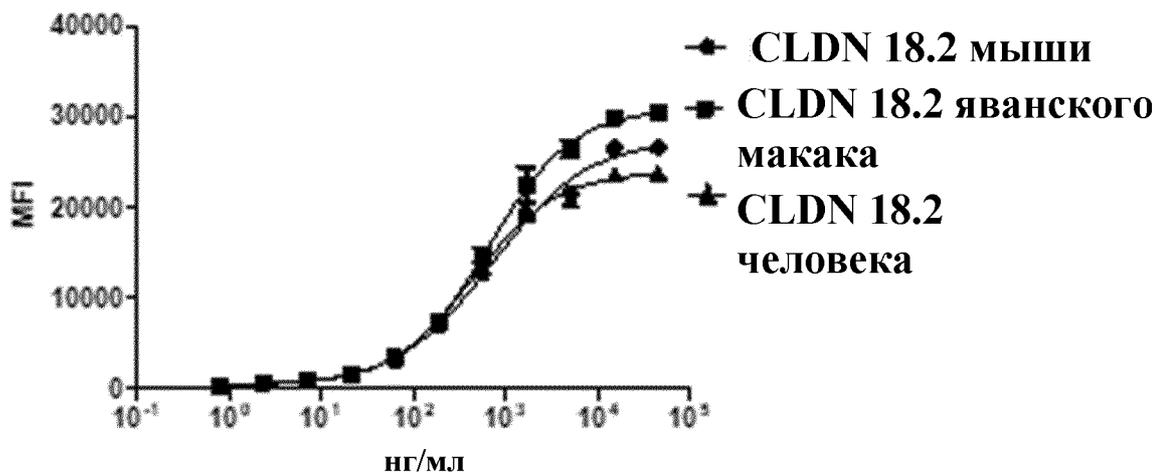
Фиг. 6



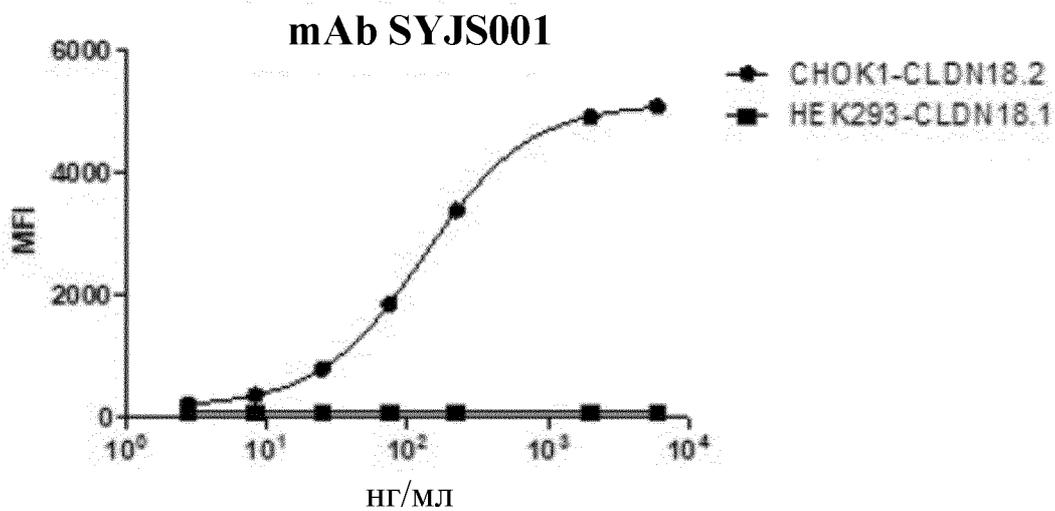
Фиг. 7



Фиг. 8

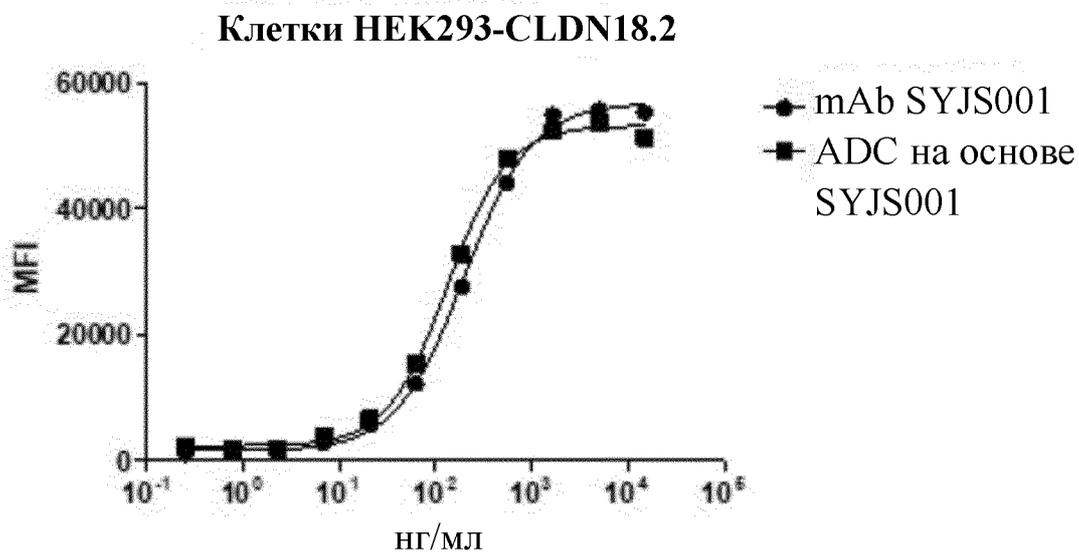


Фиг. 9



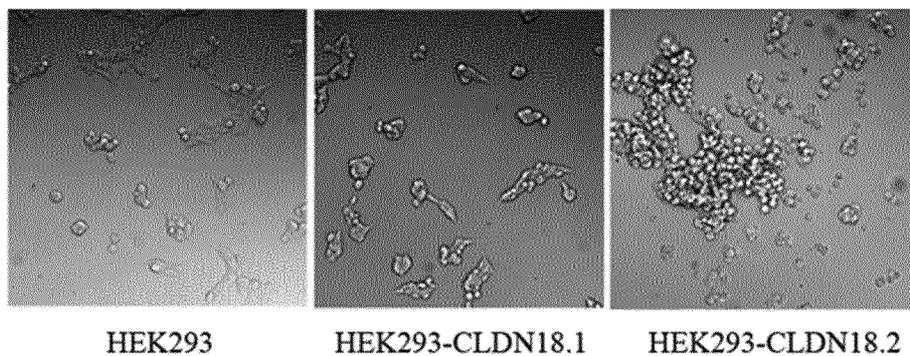
| EC ₅₀ | нг/мл |
|------------------|-------|
| mAb SYJS001 | 131,8 |

Фиг. 10

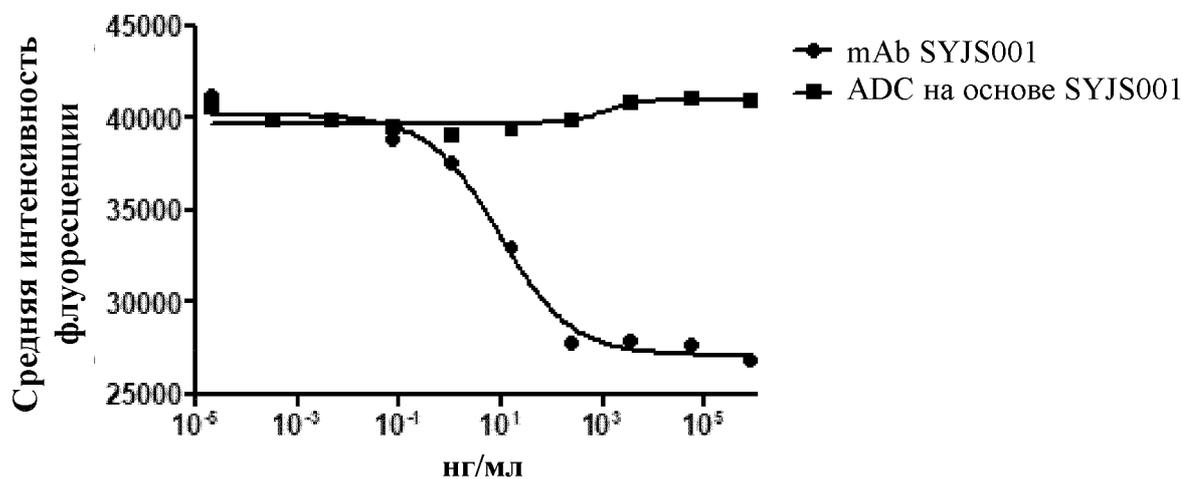


| EC ₅₀ | нг/мл |
|-----------------------|-------|
| mAb SYJS001 | 149 |
| ADC на основе SYJS001 | 133 |

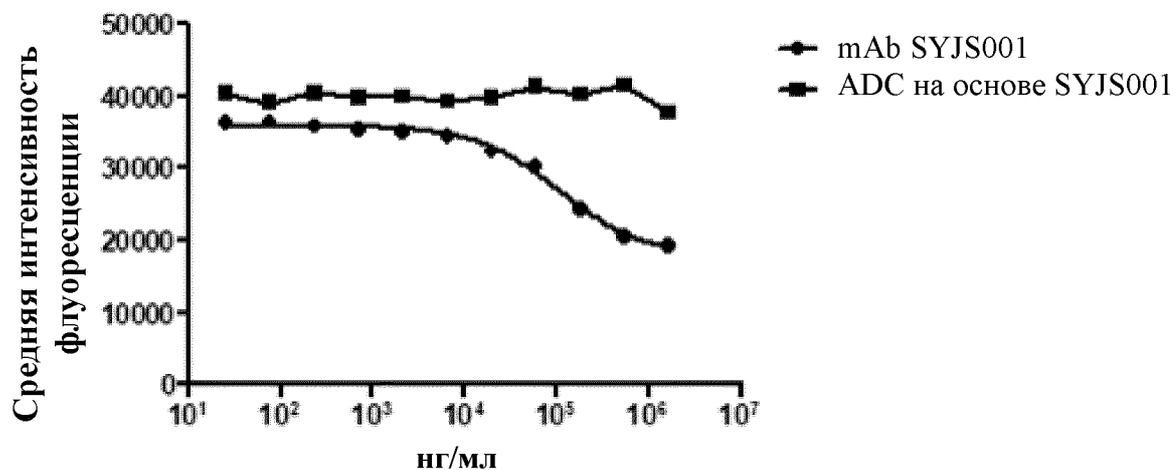
Фиг. 11



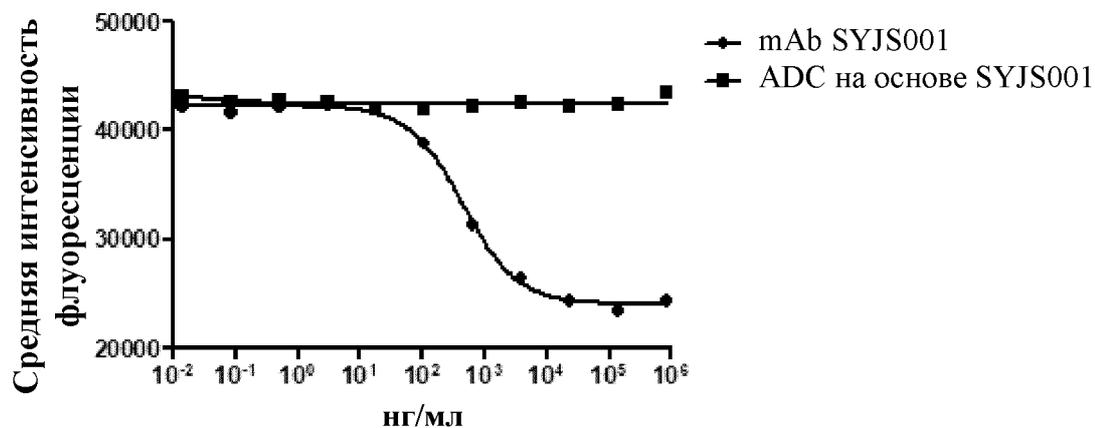
Фиг. 12



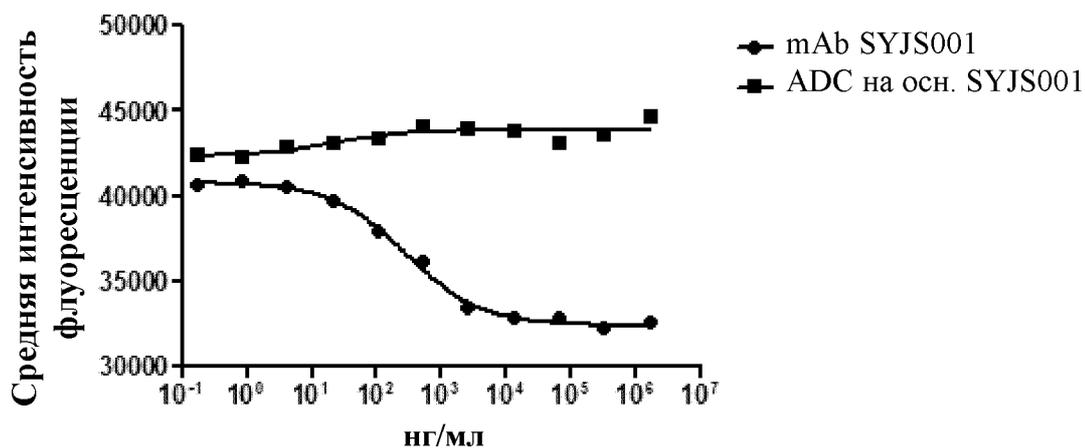
Фиг. 13



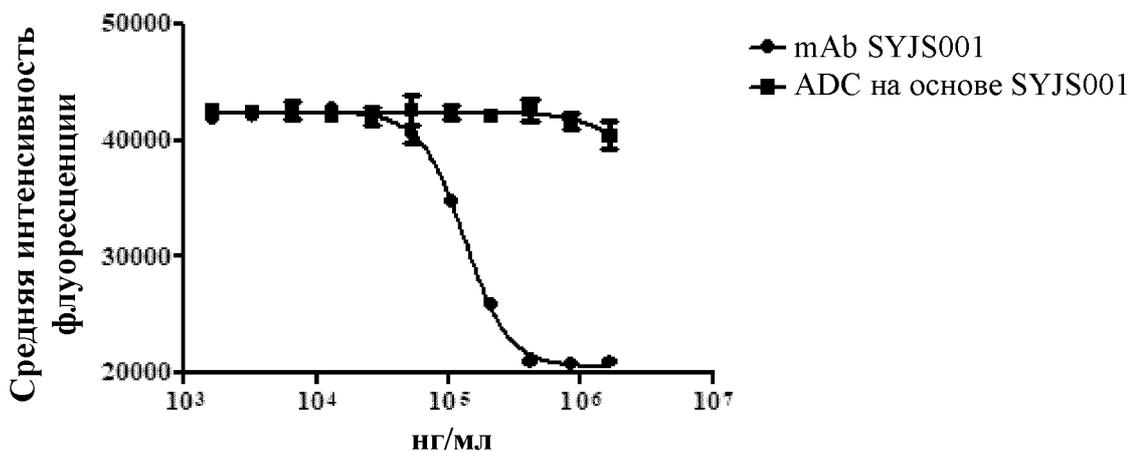
Фиг. 14



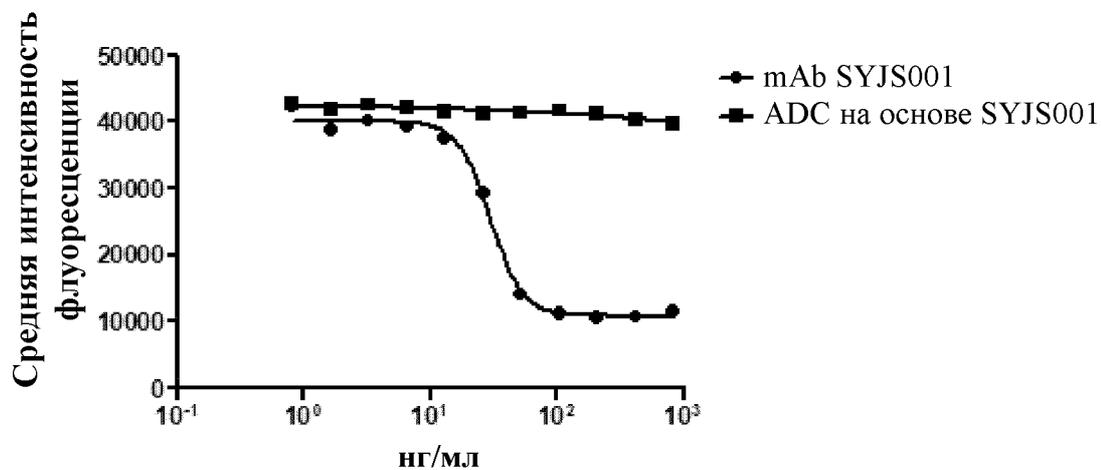
Фиг. 15



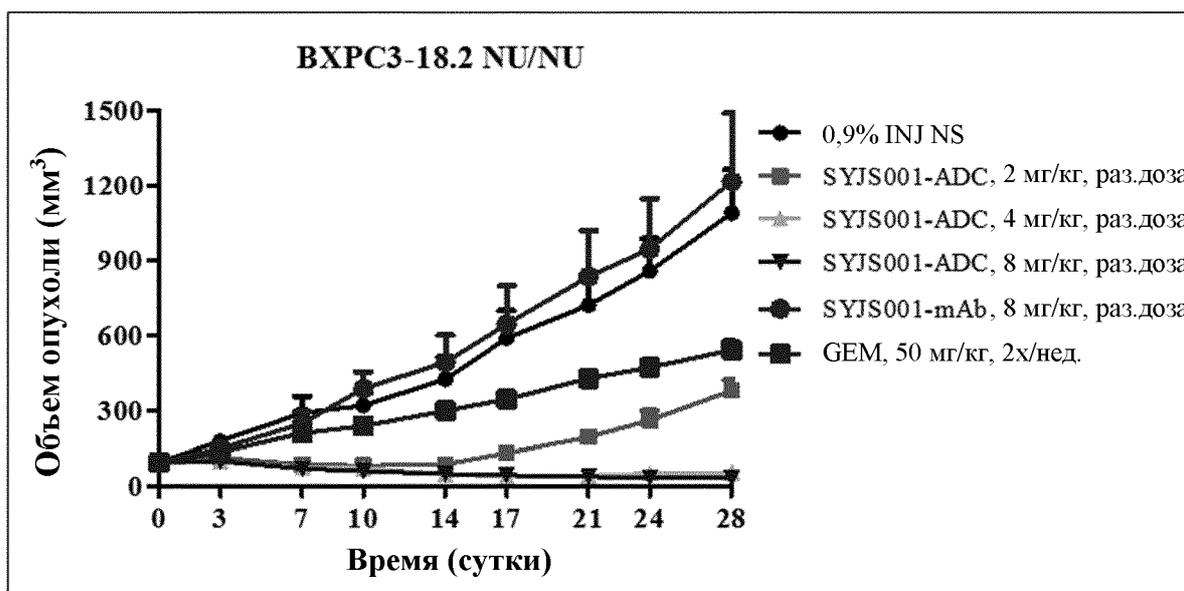
Фиг. 16



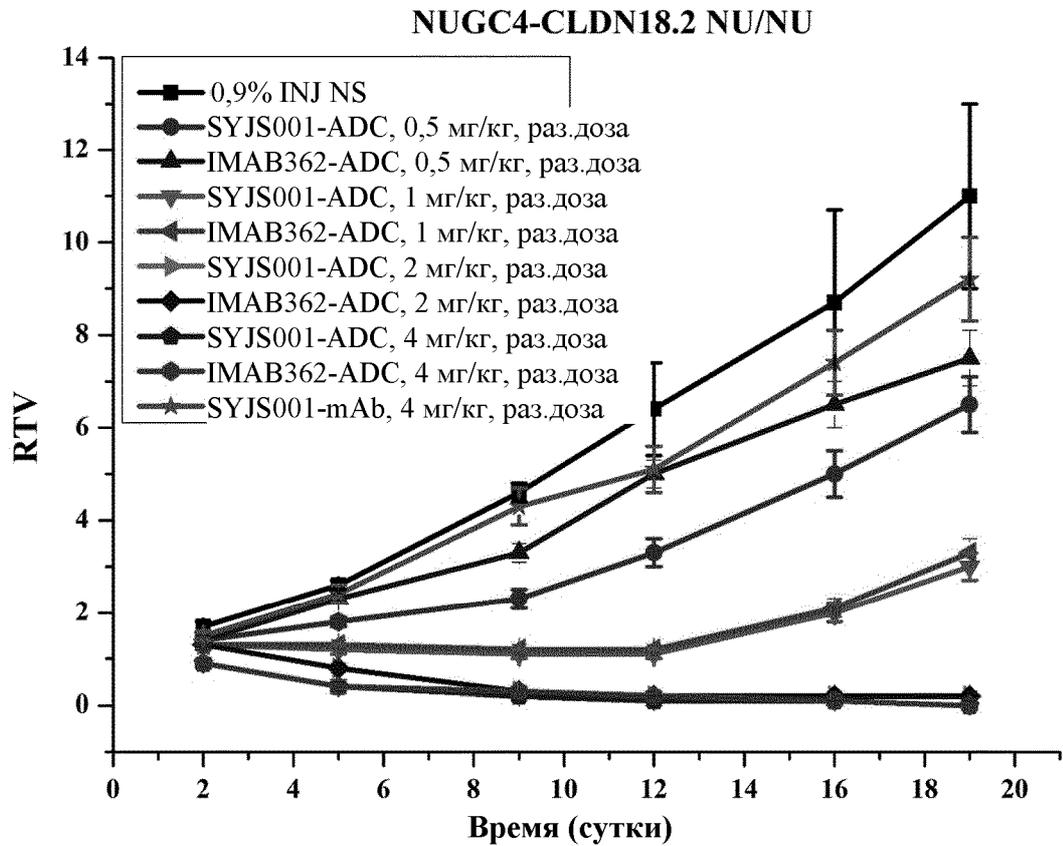
Фиг. 17



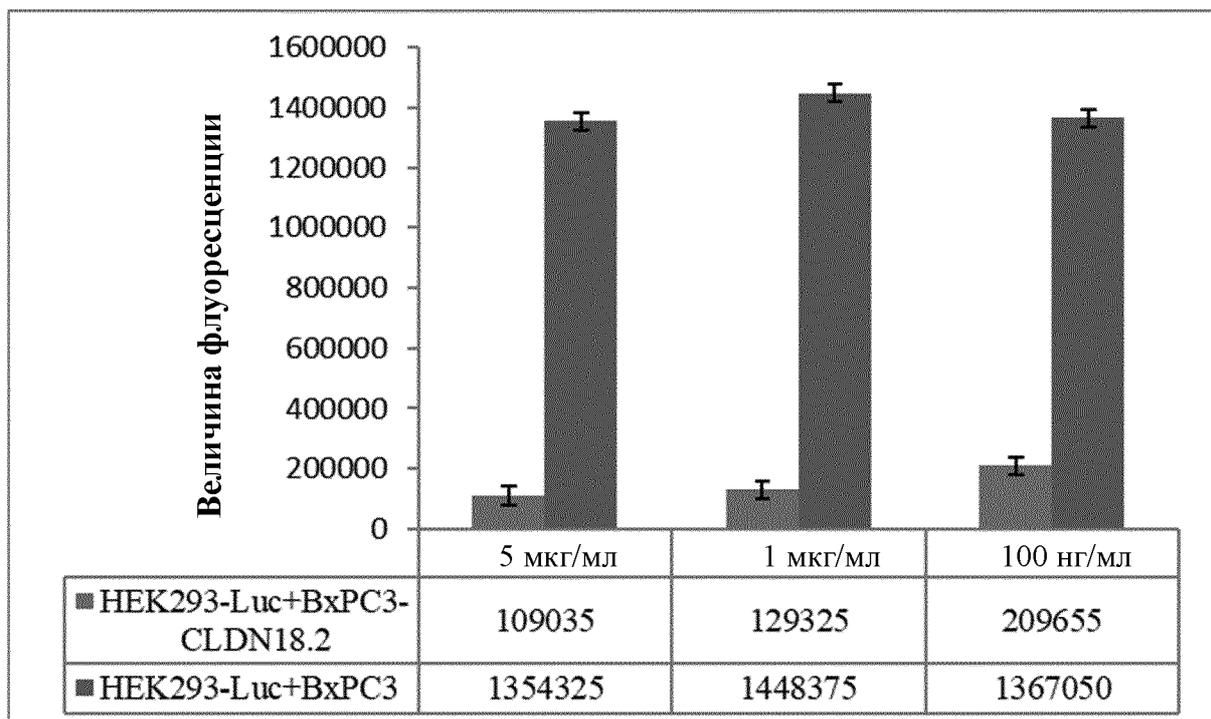
Фиг. 18



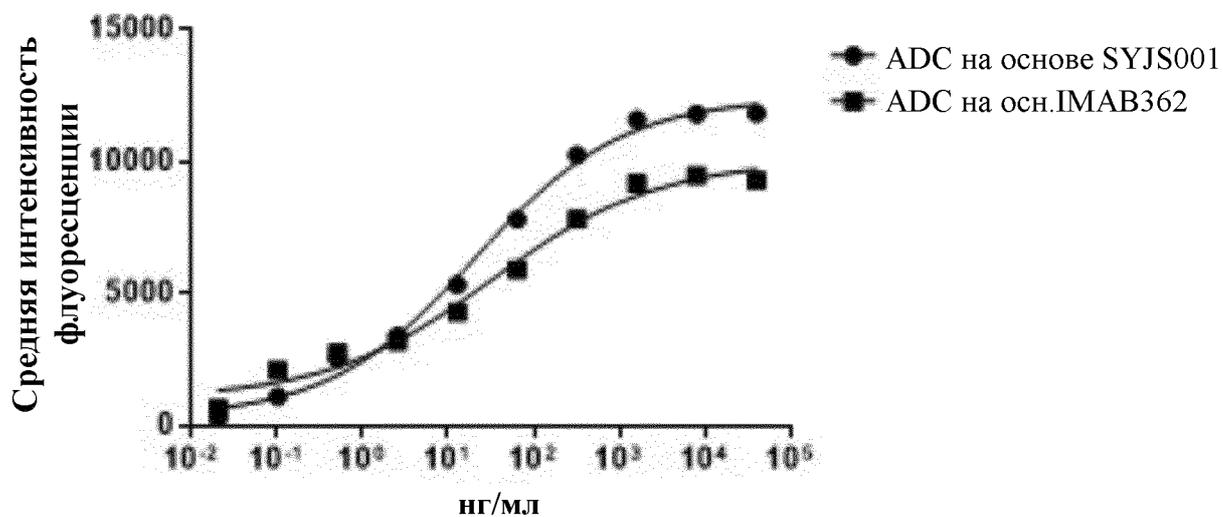
Фиг. 21



Фиг. 22

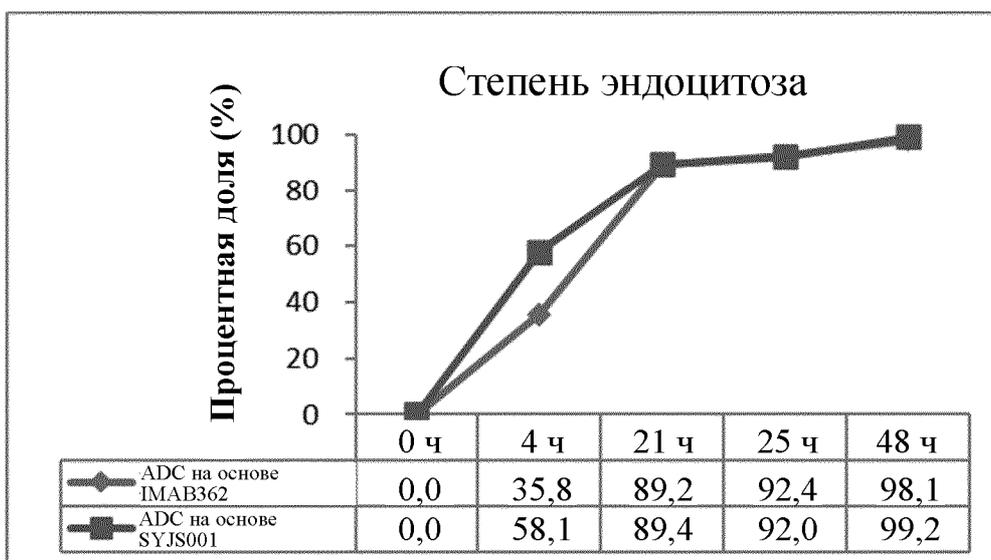


Фиг. 23

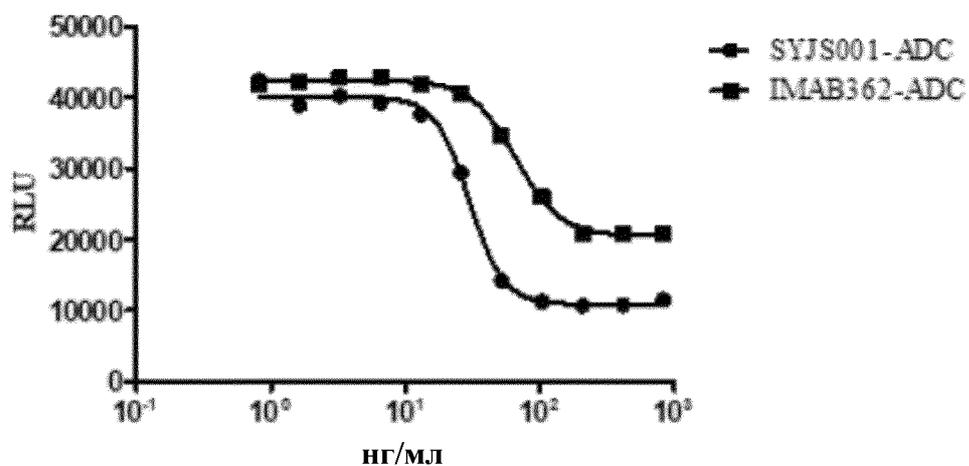


| ADC | ED ₅₀ (нг/мл) |
|-----------------------|--------------------------|
| ADC на основе SYJS001 | 20,8 |
| ADC на основе IMAB362 | 43,01 |

Фиг. 24

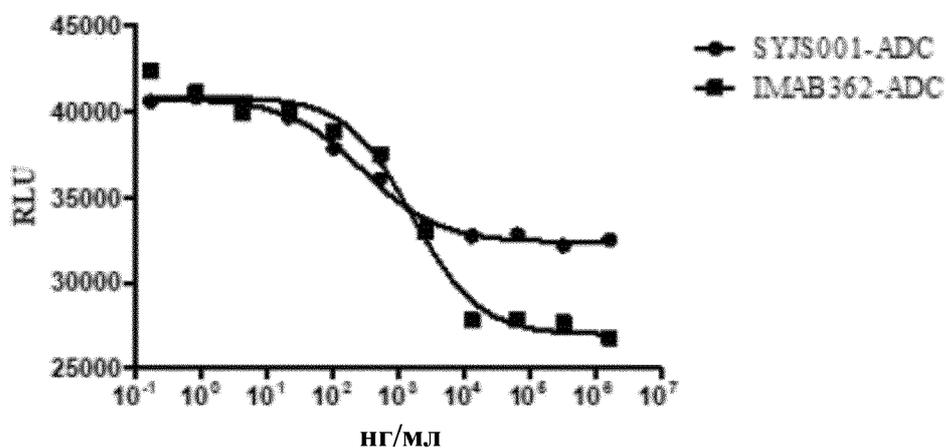


Фиг. 25



| ADC | IC ₅₀ (нг/мл) |
|-------------|--------------------------|
| SYJS001-ADC | 29,9 |
| IMAB362-ADC | 63,3 |

Фиг. 26



| ADC | IC ₅₀ (нг/мл) |
|-------------|--------------------------|
| SYJS001-ADC | 293,5 |
| IMAB362-ADC | 1662,0 |