

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392682** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.01

(51) Int. Cl. *A61K 33/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.24

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
КЛАУДИНА 18.2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **63/166,019**

(32) **2021.03.25**

(33) **US**

(86) **PCT/JP2022/017017**

(87) **WO 2022/203090 2022.09.29**

(71) Заявитель:
АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК. (JP)

(72) Изобретатель:

**Бхатгачариа Праноб П. (US), Вэн
Джейн, Кинугаса Фумитака (JP)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагается комбинированная терапия для лечения и/или предотвращения заболеваний, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая раковые заболевания, такие как рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичников, рак ободочной кишки, рак печени, рак головы и рак шеи, рак желчного пузыря и их метастазы.

202392682

A1

A1

202392682

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Рак желудка и пищевода (гастроэзофагеальный; ГЭ) относится к числу злокачественных новообразований с наибольшей неудовлетворенной медицинской потребностью. Рак желудка является одной из ведущих причин смерти от рака во всем мире. Заболеваемость раком пищевода увеличилась в последние десятилетия, что совпало со сдвигом в гистологическом типе и локализации первичной опухоли. Аденокарцинома пищевода в настоящее время более распространена, чем плоскоклеточная карцинома в Соединенных Штатах и Западной Европе, причем большинство опухолей локализуется в дистальном отделе пищевода. Общая пятилетняя выживаемость при ГЭ раке составляет 20-25%, несмотря на агрессивность общепринятого стандартного лечения, связанную со значительными побочными эффектами.

У большинства больных наблюдается местно-распространенное или метастатическое заболевание. Для этих пациентов лечением первой линии является химиотерапия. Схемы лечения основаны на основе производных платины и фторпиримидина, в основном в сочетании с третьим соединением (например, таксаном или антрациклинами). Тем не менее, медиана выживаемости без прогрессирования от 5 до 7 месяцев и медиана общей выживаемости от 9 до 11 месяцев являются наилучшими показателями, которых можно ожидать.

Отсутствие существенной пользы от различных схем комбинированной химиотерапии нового поколения для этих видов онкологических заболеваний стимулировало исследования по использованию таргетных агентов. Недавно для лечения Her2/neu-положительного рака желудка и пищевода был одобрен трастузумаб. Однако, поскольку только около 20% пациентов имеют право на это лечение, медицинские потребности по-прежнему высоки.

Молекула плотного соединения, сплайс-вариант 2 клаудина 18 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)) является представителем семейства клаудинов, белков плотного соединения. CLDN18.2 представляет собой трансмембранный белок массой 27,8 кДа, содержащий четыре трансмембранных домена с двумя небольшими внеклеточными петлями.

В нормальных тканях, за исключением желудка, с помощью RT-ПЦР экспрессия CLDN18.2 не обнаруживается. Иммуногистохимия с CLDN18.2-специфическими антителами показывает желудок как единственную положительную ткань.

CLDN18.2 представляет собой высокоселективный антиген желудочной линии, экспрессируемый исключительно на короткоживущих дифференцированных

эпителиальных клетках желудка. CLDN18.2 сохраняется в ходе злокачественной трансформации и поэтому часто экспонируется на поверхности клеток рака желудка человека. Кроме того, этот пан-опухолевый антиген aberrантно экспрессируется на значительных уровнях в аденокарциномах пищевода, поджелудочной железы и легкого. Белок CLDN18.2 также локализуется в метастазах аденокарциномы рака желудка в лимфатические узлы и в отдаленных метастазах, особенно в яичники (так называемые опухоли Крукенберга) и в метастазах печени.

Химерное антитело IgG1 IMAB362 (золбетуксимаб [ранее называвшееся клаудиксимаб]), направленное против CLDN18.2, было разработано Ganymed Pharmaceuticals AG. Это антитело включает тяжелую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51, и легкую цепь, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. IMAB362 распознает первый внеклеточный домен (ECD1) CLDN18.2 с высокой аффинностью и специфичностью. IMAB362 не связывается ни с каким другим представителем семейства клаудинов, включая близкородственный сплайс-вариант 1 клаудина 18 (CLDN18.1). IMAB362 проявляет точную специфичность к опухолевым клеткам и объединяет два независимых высокоэффективных механизма действия. При связывании с мишенью IMAB362 опосредует уничтожение клеток, главным образом, посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). Таким образом, IMAB362 эффективно лизирует CLDN18.2-положительные клетки, включая клеточные линии рака желудка человека *in vitro* и *in vivo*. Противоопухолевая эффективность IMAB362 была продемонстрирована на мышах с ксенотрансплантированными опухолями, инокулированными CLDN18.2-положительными линиями клеток рака. Кроме того, IMAB362 оценивался в клинических исследованиях в качестве монотерапии и в сочетании с химиотерапией эпирубицином, оксалиплатином и капецитабином (ЭОК) или в сочетании с иммуномодулирующей терапией (золедроновая кислота [ЗК] с интерлейкином-2 или без него [IL-2]) для лечения взрослых пациентов с CLDN18.2-положительной прогрессирующей аденокарциномой желудка, пищевода или желудочно-пищеводного соединения(GEJ).

Плохой прогноз некоторых видов рака, таких как, например, гастроэзофагеальный рак, подчеркивает необходимость дополнительных подходов к лечению.

В данной заявке авторы раскрывают, что комбинированное введение анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, эффективно при лечении CLDN18.2-экспрессирующего рака,

такого как CLDN18.2-положительные аденокарциномы желудка и желудочно-пищеводного соединения.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении в целом предлагается комбинированная терапия для эффективного лечения и/или предотвращения заболеваний, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая онкологические заболевания, такие как рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак яичников, рак ободочной кишки, рак печени, рак головы и шеи и рак желчного пузыря и метастазы, в частности метастазы рака желудка, такие как опухоли Крукенберга, перитонеальные метастазы, метастазы в печень и метастазы в лимфатические узлы. Особенно предпочтительными онкологическими заболеваниями являются аденокарциномы желудка, пищевода, протоков поджелудочной железы, желчных протоков, легких и яичников.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения пациента, включающий введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения или профилактики рака у пациента, включающий введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ ингибирования роста опухоли у онкологического пациента, включающий введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в данном описании, соединение платины представляет собой оксалиплатин.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, соединение фторпиримидина или его предшественник выбирают из группы, состоящей из фторурацила (5-ФУ), капецитабина, флоксуридина, тегафура, доксифлуридина и кармофура. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, соединение фторпиримидина или его предшественник представляет собой фторурацил (5-ФУ) или капецитабин. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем

описании, соединение фторпиримидина или его предшественник представляет собой фторурацил (5-ФУ).

В одном воплощении всех раскрытых в настоящем описании аспектов способ включает введение оксалиплатина и 5-фторурацила или его предшественника.

В одном воплощении всех раскрытых в настоящем описании аспектов способ включает введение оксалиплатина и 5-фторурацила или оксалиплатина и капецитабина.

В одном воплощении всех раскрытых в настоящем описании аспектов способ включает введение фолиновой кислоты.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, способ включает введение схемы химиотерапии mFOLFOX6.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, ингибитор иммунной контрольной точки выбран из анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем документе, анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (OPDIVO; BMS-936558), пембролизумаб (KEYTRUDA; MK-3475), пидилизумаб (CT-011), цемиплимаб (LIBTAYO, REGN2810), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ 63723283), торипалимаб (JS001), AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, тислелизумаб (BGB-A317), ABBV-181, BI 754091 или SHR-1210.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ниволумаб.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем документе, анти-PD-L1 антитело представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ; RG7446; MPDL3280A; R05541267), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559, авелумаб (bavencio), лодаполимаб (LY3300054), CX-072 (Proclaim-CX-072), FAZ053, KN035 или MDX-1105.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ помимо введения анти-CLDN18.2 антитела включает введение оксалиплатина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты и ниволумаба.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ в дополнение к введению анти-CLDN18.2 антитела включает схему химиотерапии mFOLFOX6 и ниволумабом.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, анти-CLDN18.2 антитело связывается с нативными эпитопами CLDN18.2, присутствующими на поверхности живых клеток. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, анти-CLDN18.2 антитело представляет собой моноклональное, химерное или гуманизированное антитело или фрагмент антитела. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящей заявке, анти-CLDN18.2 антитело связано с терапевтическим агентом, таким как токсин, радиоизотоп, лекарственное средство или цитотоксический агент.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело связывается с первой внеклеточной петлей CLDN18.2.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело опосредует гибель клеток посредством одного или нескольких из следующих факторов: лизиса, опосредованного комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ), лизиса, опосредованного антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ), индукции апоптоза и ингибирования пролиферации.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из:

(i) антитела, продуцируемого и/или получаемого из клона, депонированного под номером доступа DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 или DSM ACC 2810,

(ii) антитела, которое представляет собой химеризированную или гуманизированную форму антитела согласно (i),

(iii) антитела, обладающего специфичностью антитела согласно (i), и

(iv) антитела, включающего антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающий сайт, в частности варибельную область, антитела согласно (i) и предпочтительно обладающего специфичностью антитела согласно (i).

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело включает CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 45-52 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 70-77 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 116-126 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащий последовательность в положениях 47-58 последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 24, CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащий последовательность в положениях 76-78 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащий последовательность в положениях 115-123 последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело включает варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или функциональный вариант и/или варибельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или функциональный вариант.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело включает константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13 или 52, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или функциональный вариант.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, анти-CLDN18.2 антитело включает тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 51, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или функциональный вариант и/или легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или функциональный вариант.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает введение анти-CLDN18.2 антитела в дозе до 1000 мг/м². В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает повторное введение анти-CLDN18.2 антитела в дозе от 300 до 600 мг/м². В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает введение начальной дозы анти-CLDN18.2 антитела в диапазоне от 600 до 1000 мг/м², например, 800 мг/м², с последующим введением анти-CLDN18.2 антитела повторно в дозе от 300 до 800 мг/м², например, 400 мг/м². В различных воплощениях повторное введение включает введение каждые 2-4 недели, например, каждые 2 недели. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает введение анти-CLDN18.2 антитела в соответствии с одним из следующих вариантов:

- (i) начальная доза 800 мг/м² с последующими дозами 600 мг/м² каждые 3 недели;

(ii) начальная доза 600 мг/м² с последующими дозами по 600 мг/м² каждые 3 недели;

(iii) начальная доза 800 мг/м² с последующими дозами по 400 мг/м² каждые 2 недели; или

(iv) начальная доза 600 мг/м² с последующими дозами по 400 мг/м² каждые 2 недели.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает введение анти-CLDN18.2 антитела в виде внутривенной (в/в) инфузии, например, в виде внутривенной (в/в) инфузии в течение как минимум 2 часов. В/в инфузия может быть прервана или замедлена для контроля токсичности.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак является положительным по CLDN18.2. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичника, рака ободочной кишки, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и метастазов. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак представляет собой опухоль Крукенберга, перитонеальные метастазы, метастазы в печень и/или метастазы в лимфатические узлы. В одном воплощении всех раскрытых в данном описании аспектов рак представляет собой аденокарциному, в частности запущенную аденокарциному. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, в частности, нижнего отдела пищевода, рака желудочно-пищеводного соединения и гастроэзофагеального рака.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак представляет собой CLDN18.2-положительную аденокарциному желудка и желудочно-пищеводного соединения. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак представляет собой метастатическую или местно-распространенную CLDN18.2-положительную аденокарциному желудка и желудочно-пищеводного соединения. В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, рак представляет собой метастатическую или местно-распространенную CLDN18.2-положительную, HER2-отрицательную аденокарциному желудка и желудочно-пищеводного соединения.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, способ включает введение анти-CLDN18.2 антитела, включающего тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 или 51, и легкую цепь,

содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, оксалиплатина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты и ниволумаба.

В одном воплощении всех аспектов, раскрытых в настоящем описании, CLDN18.2 имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается медицинский препарат, содержащий анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

В одном воплощении всех раскрытых в данном описании аспектов медицинский препарат представляет собой набор. В одном воплощении набор содержит анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранной из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, в отдельных контейнерах.

В одном воплощении всех раскрытых в данном описании аспектов медицинский препарат дополнительно включает печатные инструкции по применению препарата для лечения рака, в частности по применению препарата в способе по изобретению. Различные воплощения медицинского препарата и, в частности, анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, являются такими, как описанные выше для способов по изобретению.

В настоящем изобретении также предлагаются раскрытые здесь агенты, такие как анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественника и ингибитор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для применения в терапии. В одном воплощении такая терапия включает лечение и/или предотвращение заболеваний, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включая онкологические заболевания, такие как описанные в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также относится к одному или нескольким агентам, описанным в настоящей заявке, таким как анти-CLDN18.2 антитело для применения в описанных в данной заявке способах, например, анти-CLDN18.2 антитело для введения в комбинации с соединением платины, соединением фторпиримидина или его предшественника и ингибитором иммунной контрольной точки, выбранным из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. В настоящем изобретении также предлагается применение одного или нескольких агентов, раскрытых в настоящей заявке, таких как анти-CLDN18.2 антитело, для приготовления фармацевтической композиции для

применения в способах, описанных в настоящей заявке, например, для применения анти-CLDN18.2 антитела при приготовлении фармацевтической композиции для введения в комбинации с соединением платины, соединением фторпиримидина или его предшественником и ингибитором иммунной контрольной точки, выбранным из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается анти-CLDN18.2 антитело для применения в способе лечения или профилактики рака у пациента, включающем введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается анти-CLDN18.2 антитело для применения в способе ингибирования роста опухоли у онкологического пациента, включающем введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается ингибитор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для применения в способе лечения или профилактики рака у пациента, включающем введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается ингибитор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для применения в способе ингибирования роста опухоли у онкологического пациента, включающем введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественник и ингибитор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для применения в способе лечения или профилактики рака у пациента. В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественник и ингибитор иммунной

контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для применения в способе ингибирования роста опухоли у онкологического пациента. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается применение анти-CLDN18.2 антитела для приготовления фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака у пациента, при этом анти-CLDN18.2 антитело следует вводить вместе с соединением платины, соединением фторпиримидина или его предшественника и ингибитором иммунной контрольной точки, выбранным из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается применение анти-CLDN18.2 антитела для приготовления фармацевтической композиции для ингибирования роста опухоли у онкологического пациента, при этом анти-CLDN18.2 антитело следует вводить вместе с соединением платины, соединением фторпиримидина или его предшественником и ингибитором иммунной контрольной точки, выбранным из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предлагается применение ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для приготовления фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака у пациента, где ингибитор иммунной контрольной точки подлежит введению вместе с анти-CLDN18.2 антителом, соединением платины и соединением фторпиримидина или его предшественником. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для приготовления фармацевтической композиции для ингибирования роста опухоли у онкологического пациента, где ингибитор иммунной контрольной точки следует вводить вместе с анти-CLDN18.2 антителом, соединением платины и соединением фторпиримидина или его предшественником. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для приготовления фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака у пациента. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1, для приготовления фармацевтической композиции для

ингибирования роста опухоли у онкологического пациента. Предпочтительные воплощения этих аспектов описаны выше для способов по изобретению.

В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает иммунотерапевтическое лечение пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию иммуноопосредованного ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию клеточно-опосредованного ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию опосредованного Т-клетками ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию опосредованного НК-клетками ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) в отношении клеток рака у пациента. В одном воплощении АЗКЦ опосредуется, по меньшей мере частично, НК-клетками. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, лечение, описанное в настоящей заявке, включает индукцию комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) в отношении клеток рака у пациента.

В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора ключевой точки иммунного ответа повышает противоопухолевую эффективность анти-CLDN18.2 антитела. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индукции иммуно-опосредованного ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индукции опосредованного иммунными клетками ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индуцирования опосредованного Т-клетками ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индукции опосредованного НК-клетками ингибирования или разрушения клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает

эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индукции антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) в отношении клеток рака у пациента. В одном воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела в отношении индукции комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) в отношении клеток рака у пациента. В другом воплощении аспектов, раскрытых здесь, введение ингибитора иммунной контрольной точки повышает эффективность анти-CLDN18.2 антитела синергическим образом.

Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут видны из следующего детального описания и из приложенной формулы изобретения.

Подробное описание изобретения

Хотя настоящее изобретение будет описано подробно ниже, следует принять к сведению, что это изобретение не ограничивается раскрытыми в настоящей заявке конкретными методологией, протоколами и реактивами, поскольку они могут меняться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для целей описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения. Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в настоящей заявке, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом в данной области.

Далее будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены с конкретными воплощениями, однако следует понимать, что они могут объединяться любым способом и в любом количестве с созданием дополнительных воплощений. По-разному описанные примеры и предпочтительные воплощения не следует рассматривать как ограничения настоящего изобретения, они предназначены исключительно для ясного описания воплощений. Следует понимать, что описание поддерживает и охватывает воплощения, которые объединяют ясно описанные воплощения с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных воплощений. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в данной заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки, если из контекста не следует иное.

Предпочтительно, чтобы используемые в данной заявке термины были определены, как описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные способы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и способы рекомбинантной ДНК, которые объясняются в литературе в данной области (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Во всем описании и формуле изобретения, которые изложены ниже, если контекст не требует иного, слово «включать» и его вариации, такие как «включает» или «включающий», будут подразумевать включение заявленных установленных компонентов, целых значений или стадий, или группы компонентов, целых значений или стадий, но не исключение любых других компонентов, целых значений или стадий, или группы компонентов, целых значений или стадий, хотя в некоторых воплощениях такие другие компоненты, целые значения или стадии могут быть исключены, т.е. объект изобретения состоит из включения установленных компонентов, целых значений или стадий, или группы компонентов, целых значений или стадий. Подразумевается, что термины, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), охватывают как форму единственного числа, так и множественного, если в настоящей заявке не указано иное или это очевидно не противоречит контексту. Перечисление интервалов в данной заявке предназначено всего лишь для того, чтобы служить в качестве способа сокращенного представления каждого индивидуального значения, попадающего в интервал. Если в данной заявке не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно приведено в данной заявке. Все способы, раскрытые в настоящем описании, могут осуществляться в любом подходящем порядке, здесь не указано иное или иное очевидным образом не следует из контекста. Использование любого из и всех примеров, или типичного выражения (например, «такой как»), представленное в данной заявке, предназначено всего лишь для лучшей иллюстрации изобретения и не является ограничением рамок изобретения, заявленного иным способом. Никакое из выражений в описании не должно рассматриваться в качестве обозначения любого незаявленного элемента, существенного для практического применения изобретения.

Несколько документов цитируется по всему тексту данного описания. Каждый из документов, процитированных в данной заявке (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, описания производителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, во всей своей полноте включен в настоящее описание в качестве ссылки. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что изобретение не

имеет права предшествовать таким публикациям в силу того, что является предшествующим изобретением по отношению к этим публикациям.

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

Термин «CLDN18.2» предпочтительно относится к CLDN18.2 человека и, в частности, к белку, содержащему, предпочтительно состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 списка последовательностей или варианту указанной аминокислотной последовательности.

Термин «CLDN18.1» предпочтительно относится к CLDN18.1 человека и, в частности, к белку, содержащему, предпочтительно состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 списка последовательностей или варианту указанной аминокислотной последовательности.

Термин «вариант», согласно изобретению, относится, в частности, к мутантам, сплайс-вариантам, конформациям, изоформам, аллельным вариантам, видовым вариантам и видовым гомологам, в частности тем, которые присутствуют в природе. Аллельный вариант относится к изменению нормальной последовательности гена, значение которого часто неясно. Полное секвенирование генов часто идентифицирует многочисленные аллельные варианты данного гена. Видовой гомолог представляет собой нуклеотидную или аминокислотную последовательность, которая происходит из другого вида по сравнению с данной нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. Термин «вариант» должен охватывать любые посттрансляционно модифицированные варианты и конформационные варианты.

Согласно изобретению, термин «CLDN18.2-положительный рак» означает рак, содержащий раковые клетки, экспрессирующие CLDN18.2, предпочтительно на своей поверхности.

Термин «клеточная поверхность» используется в соответствии с его обычным значением в данной области техники и, таким образом, означает внешнюю часть клетки, доступную для связывания белками и другими молекулами.

CLDN18.2 экспрессируется на поверхности клеток, если он локализован на поверхности указанных клеток и доступен для связывания с добавленными к клеткам CLDN18.2-специфическими антителами.

Согласно изобретению CLDN18.2, по существу, не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии ниже по сравнению с экспрессией в клетках или ткани желудка. Предпочтительно уровень экспрессии составляет менее 10%, предпочтительно менее 5%,

3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или 0,05% от уровня экспрессии в клетках желудка или ткани желудка или даже ниже. Предпочтительно, CLDN18.2 практически не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в неозлокачественной ткани, отличной от желудка, не более чем в 2 раза, предпочтительно в 1,5 раза и предпочтительно не превышает уровень экспрессии в указанной неозлокачественной ткани. Предпочтительно, CLDN18.2, по существу, не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии ниже предела обнаружения и/или если уровень экспрессии слишком низок, чтобы сделать возможным связывание с CLDN18.2-специфическими антителами, добавленными к клеткам.

Согласно изобретению, CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в нераковой ткани, отличной от ткани желудка, предпочтительно более чем в 2 раза, предпочтительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз или в 10000 раз. Предпочтительно CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии выше предела обнаружения и/или если уровень экспрессии достаточно высок, чтобы сделать возможным связывание с CLDN18.2-специфическими антителами, добавленными к клеткам. Предпочтительно экспрессируемый в клетке CLDN18.2 экспрессируется или экспонируется на поверхности указанной клетки.

Согласно изобретению, термин «заболевание» относится к любому патологическому состоянию, включая рак, в частности к тем формам рака, которые описаны в данной заявке. Любая ссылка в данной заявке на рак или конкретные формы рака также включает метастазы рака. В предпочтительном воплощении заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящей заявкой, включает клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

«Заболевания, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2» или аналогичные выражения означают, согласно изобретению, что CLDN18.2 экспрессируется в клетках пораженной ткани или органа. В одном воплощении экспрессия CLDN18.2 в клетках пораженной ткани или органа повышена по сравнению с состоянием в здоровой ткани или органе. Повышение относится к повышению, по меньшей мере, на 10%, в частности, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 100%, по меньшей мере, на 200%, по меньшей мере, на 500%, по меньшей мере, на 1000%, по меньшей мере, на 10000% или даже более. В одном воплощении, экспрессия обнаружена только в больной ткани, в то время как экспрессия в здоровой ткани репрессирована. Согласно изобретению, заболевания, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включают онкологические заболевания. Кроме того,

согласно изобретению, онкологические заболевания предпочтительно представляют собой такие, при которых клетки рака экспрессируют CLDN18.2.

Используемый в данном описании термин «онкологическое заболевание» или «рак» включает заболевание, характеризующееся аномально регулируемым клеточным ростом, пролиферацией, дифференцировкой, адгезией и/или миграцией. Под «клеткой рака» подразумевают аномальную клетку, которая растет за счет быстрой, неконтролируемой клеточной пролиферации и продолжает расти после прекращения действия стимулов, инициировавших новый рост. Предпочтительно «онкологическое заболевание» характеризуется клетками, экспрессирующими CLDN18.2, и клетками рака, экспрессирующими CLDN18.2. Клетка, экспрессирующая CLDN18.2, предпочтительно представляет собой клетку рака, предпочтительно рака, описанного в настоящей заявке.

«Аденокарцинома» представляет собой злокачественное образование, которое происходит из ткани желез. Эта ткань также является частью крупной категории тканей, известной как эпителиальная ткань. Эпителиальная ткань включает кожу, железы и множество других тканей, которые выстилают полости и органы организма. Эпителий эмбриологически происходит из эктодермы, эндодермы и мезодермы. Чтобы быть отнесенными к аденокарциноме, клеткам необязательно быть частью железы, при условии, что они обладают секреторными свойствами. Данная форма карциномы может встречаться в организме некоторых высших млекопитающих, включая человека. Хорошо дифференцированные аденокарциномы имеют тенденцию к наличию сходства с тканью железы, из которой они происходят, в то время как у плохо дифференцированных такого сходства может не быть. С помощью окрашивания клеток из биопсии, патолог определит, является ли опухоль аденокарциномой или относится к некоторым другим типам злокачественных образований. Аденокарциномы могут возникать во множестве тканей организма из-за природного повсеместного присутствия желез внутри организма. В то время как каждая из желез может секретировать вещество, отличное от того, которое секретирует другая железа, при условии, что существует экзокринная функция по отношению к клетке, считается, что железистая форма опухоли и ее злокачественная форма, таким образом, является аденокарциномой. Злокачественные аденокарциномы проникают в другие ткани и часто метастазируют при условии наличия для этого достаточного времени. Аденокарцинома яичника представляет собой наиболее распространенный тип карциномы яичника. Она включает сывороточную и слизистую аденокарциному, светлоклеточную аденокарциному и эндометриоидную аденокарциному.

Под «метастазированием» понимают распространение опухолевых клеток из места своего происхождения в другую часть организма. Образование метастазов представляет

собой очень сложный процесс и зависит от отделения злокачественных клеток от первичной опухоли, инвазии внеклеточного матрикса, проникновения через эндотелиальную базальную мембрану для входа в брюшную полость и в сосуды, и затем, после переноса с помощью кровотока, инфильтрации в органы-мишени. Наконец, рост новой опухоли в сайте-мишени зависит от ангиогенеза. Опухолевое метастазирование часто происходит даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут оставаться и развивать метастатический потенциал. В одном воплощении, термин «метастазирование», согласно изобретению, относится к «отдаленному метастазированию», т.е. к метастазированию, которое отдалено от первичной опухоли и региональной системы лимфатических узлов. В другом воплощении термин «метастазирование» по изобретению относится к метастазированию в лимфатические узлы. Одной конкретной формой метастазирования, которая поддается лечению с использованием терапии по изобретению, является метастазирование, происходящее из рака желудка в качестве первичной локализации. В предпочтительных воплощениях такие метастазы рака желудка представляют собой опухоли Крукенберга, перитонеальные метастазы, метастазы в печень и/или метастазы в лимфатические узлы.

Опухоль Крукенберга представляет собой редкую метастатическую опухоль яичника, составляющая от 1% до 2% всех опухолей яичников. Прогноз опухоли Крукенберга по-прежнему очень плохой, и не существует общепризнанного лечения опухолей Крукенберга. Опухоль Крукенберга представляет собой метастатическую перстневидно-клеточную аденокарциному яичника. Желудок является первичным участком локализации в большинстве случаев опухоли Крукенберга (70%). Карциномы толстой кишки, аппендикса и молочной железы (в основном инвазивная дольковая карцинома) являются следующими наиболее распространенными первичными локализациями. Сообщалось о редких случаях опухоли Крукенберга, возникающей из карцином желчного пузыря, желчных путей, поджелудочной железы, тонкой кишки, фатерова сосочка, шейки матки и мочевого пузыря/урахуса. Интервал между диагнозом первичной карциномы и последующим обнаружением поражения яичников обычно составляет 6 месяцев или меньше, но сообщалось о более длительных периодах. Во многих случаях первичная опухоль очень мала и может избежать обнаружения. История предшествующей карциномы желудка или другого органа может быть получена только в 20–30% случаев. Опухоль Крукенберга является примером избирательного распространения рака, чаще всего в области желудка и яичников. Эта ось распространения опухоли исторически привлекала внимание многих патологоанатомов, особенно когда было обнаружено, что новообразования желудка избирательно

метастазируют в яичники без вовлечения других тканей. Путь метастазирования карциномы желудка в яичники долгое время оставался загадкой, но теперь очевидно, что ретроградное лимфатическое распространение является наиболее вероятным путем метастазирования. Женщины с опухолями Крукенберга, как правило, необычно молоды для пациентов с метастатической карциномой, поскольку они обычно находятся на пятом десятилетии своей жизни и имеют средний возраст 45 лет. Этот молодой возраст для распространения опухоли может быть частично связан с повышенной частотой перстневидно-клеточной карциномы желудка у молодых женщин. Общие симптомы обычно связаны с поражением яичников, наиболее распространенными из которых являются боль в животе и вздутие живота (в основном из-за обычно двусторонних и часто больших образований яичников). Остальные пациенты имеют неспецифические желудочно-кишечные симптомы или заболевание протекает бессимптомно. Кроме того, сообщается, что опухоль Крукенберга связана с вирилизацией в результате продукции гормонов стромой яичников. Асцит присутствует в 50% случаев и обычно выявляет злокачественные клетки. Опухоли Крукенберга являются двусторонними более чем в 80% зарегистрированных случаев. Яичники обычно асимметрично увеличены, с выпуклым контуром. Поверхности разрезов желтые или белые; они обычно твердые, хотя иногда бывают кистозными. Важно отметить, что капсульная поверхность яичников с опухолями Крукенберга обычно гладкая и не имеет спаек или перитонеальных отложений. Следует отметить, что другие метастатические опухоли в яичники, как правило, ассоциированы с поверхностными имплантатами. Это может объяснить, почему макроскопическая морфология опухоли Крукенберга может обманчиво выглядеть как первичная опухоль яичника. Однако билатерализм опухоли Крукенберга согласуется с ее метастатической природой. У пациентов с опухолями Крукенберга общая смертность значительно выше. Большинство пациентов умирают в течение 2 лет (медиана выживаемости 14 мес). Несколько исследований показывают, что прогноз плохой, когда первичная опухоль идентифицируется после обнаружения метастазов в яичник, и ухудшается, если первичная опухоль остается скрытой. В литературе четко не установлено оптимальной стратегии лечения опухолей Крукенберга. Вопрос о том, следует ли выполнять хирургическую резекцию, не был должным образом решен. Химиотерапия или лучевая терапия не оказывают существенного влияния на прогноз пациентов с опухолями Крукенберга.

В данном контексте термины «лечение», «лечить» или «терапевтическое вмешательство» относятся к наблюдению и уходу за субъектом с целью борьбы с таким состоянием, как заболевание или расстройство. Термины предназначены для охвата полного спектра лечения данного состояния, от которого страдает субъект, например,

введение терапевтически эффективного соединения для облегчения симптомов или осложнений, для замедления прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, для облегчения или ослабления симптомов и осложнений и/или лечения или устранения заболевания, расстройства или состояния, а также предотвращения состояния, при этом предотвращение должно пониматься как наблюдение и уход за индивидуумом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или расстройством и включает введение активных соединений для предотвращения появления симптомов или осложнений.

Термин «терапевтическое лечение» относится к любому лечению, которое улучшает состояние здоровья и/или продлевает (увеличивает) продолжительность жизни индивидуума. Указанное лечение может устранить заболевание у индивидуума, остановить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, подавить или замедлить развитие заболевания у индивидуума, уменьшить частоту или тяжесть симптомов у индивидуума и/или уменьшить рецидив у индивидуума, который в настоящее время имеет или ранее имел заболевание.

Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» относятся к любому лечению, которое предназначено для предотвращения возникновения заболевания у индивидуума. Термины «профилактическое лечение» или «превентивное лечение» используются в данной заявке взаимозаменяемо.

Термины «индивидуум» и «субъект» используются в данной заявке взаимозаменяемо. Они относятся к человеку или другому млекопитающему (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, корове, свинье, овце, лошади или примату), которые могут быть поражены или быть подвержены заболеванию или расстройству (например, раку), но могут иметь или не иметь заболевания или расстройства. Во многих воплощениях индивидуумом является человек. Если не указано иное, термины «индивидуум» и «субъект» не обозначают конкретный возраст и, таким образом, охватывают взрослых, пожилых, детей и новорожденных. В воплощениях настоящего изобретения «индивидуум» или «субъект» является «пациентом».

Термин «пациент» означает индивидуума или субъекта, подлежащего лечению, в частности, больного индивидуума или субъекта.

Используемый в данном описании термин «иммунная контрольная точка» относится к регуляторам иммунной системы и, в частности, к костимулирующим и ингибирующим сигналам, которые регулируют амплитуду и качество распознавания антигена Т-клеточными рецепторами. В некоторых воплощениях иммунная контрольная точка представляет собой ингибирующий сигнал. В некоторых воплощениях

ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и/или PD-L2.

Рецептор «запрограммированной смерти-1 (PD-1)» относится к иммуноингибирующему рецептору, принадлежащему к семейству CD28. PD-1 экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами, PD-L1 (также известным как B7-H1 или CD274) и PD-L2 (также известным как B7-DC или CD273). Используемый в данном описании термин «PD-1» включает человеческий PD-1 (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. «Лиганд запрограммированной смерти-1 (PD-L1)» является одним из двух гликопротеиновых лигандов клеточной поверхности для PD-1 (другим является PD-L2), который подавляет активацию Т-клеток и секрецию цитокинов при связывании с PD-1. Используемый в данном описании термин «PD-L1» включает человеческий PD-L1 (hPD-L1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L1, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Используемый в данном описании термин «PD-L2» включает человеческий PD-L2 (hPD-L2), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L2, а также аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L2. Лиганды PD-1 (PD-L1 и PD-L2) экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток, таких как дендритные клетки или макрофаги, и других иммунных клеток. Связывание PD-1 с PD-L1 или PD-L2 приводит к подавлению активации Т-клеток. Клетки рака, экспрессирующие PD-L1 и/или PD-L2, способны выключать Т-клетки, экспрессирующие PD-1, что приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа. Взаимодействие между PD-1 и его лигандами приводит к уменьшению инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, уменьшению пролиферации, опосредованной Т-клеточным рецептором, и ускользанию злокачественных клеток от иммунного ответа. Иммуносупрессию можно обратить вспять, ингибируя локальное взаимодействие PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2.

Многие иммунные контрольные точки регулируются взаимодействиями между специфическими парами рецепторов и лигандов, такими как описанные выше. Таким образом, белки иммунных контрольных точек опосредуют передачу сигналов иммунных контрольных точек. Например, белки контрольных точек прямо или косвенно регулируют активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток и/или функцию Т-клеток. Злокачественные опухолевые клетки часто используют эти контрольные точки, чтобы защитить себя от атак со стороны иммунной системы. Следовательно, функция белков контрольных точек, которая модулируется в соответствии с настоящим изобретением, обычно представляет

собой регуляцию активации Т-клеток, пролиферации Т-клеток и/или функции Т-клеток. Таким образом, белки иммунных контрольных точек регулируют и поддерживают аутоотолерантность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов.

Используемый в данном описании термин «модулятор иммунных контрольных точек» или «модулятор контрольных точек» относится к молекуле или соединению, которое модулирует функцию одного или нескольких белков контрольных точек. Модуляторы иммунных контрольных точек обычно способны модулировать аутоотолерантность и/или амплитуду и/или продолжительность иммунного ответа. Модулятор иммунных контрольных точек, используемый в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно модулирует функцию одного или нескольких белков контрольных точек человека и, таким образом, является «модулятором контрольных точек человека». В частности, модулятор контрольных точек человека, используемый в соответствии с данным изобретением, представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек.

Используемый в данном описании термин «ингибитор иммунных контрольных точек» или «ингибитор контрольных точек» относится к молекуле, которая полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует один или несколько белков контрольных точек или полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует экспрессию одного или нескольких белков контрольных точек. В некоторых воплощениях ингибитор иммунных контрольных точек связывается с одним или несколькими белками контрольных точек. В некоторых воплощениях ингибитор иммунных контрольных точек связывается с одной или несколькими молекулами, регулируемыми белки контрольных точек. В некоторых воплощениях ингибитор иммунных контрольных точек связывается с предшественниками одного или нескольких белков контрольных точек, например, на уровне ДНК или РНК. Можно использовать любой агент, который действует как ингибитор контрольных точек в соответствии с настоящим изобретением.

Термин «частично», используемый в данном описании, означает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от уровня, например, уровня ингибирования белка контрольной точки.

В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки, подходящий для применения в настоящем изобретении, представляет собой антагонист ингибирующих сигналов, например, антитело, нацеленное, например, на PD-1 или PD-L1.

В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки предотвращает подавляющие сигналы, связанные с иммунной контрольной точкой. В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которые нарушают ингибирующую передачу сигналов, связанную с иммунной контрольной точкой. В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой низкомолекулярный ингибитор, который нарушает ингибирующую передачу сигналов. В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор на основе пептида, который нарушает ингибирующую передачу сигналов. В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой молекулу ингибиторной нуклеиновой кислоты, которая нарушает передачу ингибирующего сигнала.

В некоторых воплощениях ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело, его фрагмент или миметик антитела, которые предотвращают взаимодействие между белками-блокаторами контрольных точек, например, антитело или его фрагмент, который предотвращает взаимодействие между PD-1 и PD-L1 или PD-L2.

Ингибирование или блокирование ингибирующей передачи сигналов иммунных контрольных точек, как описано в настоящей заявке, приводит к предотвращению или обращению вспять подавления иммунитета и установлению или усилению Т-клеточного иммунитета против злокачественных опухолевых клеток. В одном воплощении ингибирование передачи сигналов иммунных контрольных точек, как описано в настоящей заявке, уменьшает или ингибирует дисфункцию иммунной системы. В одном воплощении ингибирование передачи сигналов иммунных контрольных точек, как описано в настоящей заявке, делает дисфункциональные иммунные клетки менее дисфункциональными. В одном воплощении ингибирование передачи сигналов иммунных контрольных точек, как описано в настоящей заявке, делает дисфункциональную Т-клетку менее дисфункциональной.

Термин «дисфункция», используемый в настоящем описании, относится к состоянию сниженной иммунной реакции на антигенную стимуляцию. Этот термин включает общие элементы как истощения, так и/или анергии, при которых может происходить распознавание антигена, но последующий иммунный ответ неэффективен для контроля инфекции или роста опухоли. Дисфункция также включает состояние, при котором распознавание антигена замедлено из-за дисфункции иммунных клеток.

Используемый в настоящем описании термин «дисфункциональная» также относится к иммунной клетке, находящейся в состоянии сниженного иммунного ответа на стимуляцию антигеном. Дисфункциональность включает невосприимчивость к

распознаванию антигена и нарушение способности переводить распознавание антигена в нижележащие эффекторные функции Т-клеток, такие как пролиферация, продуцирование цитокинов (например, IL-2) и/или уничтожение клеток-мишеней.

Термин «анергия», используемый в настоящем описании, относится к состоянию невосприимчивости к антигенной стимуляции, возникающему из-за неполных или недостаточных сигналов, доставляемых через Т-клеточный рецептор (TCR). Анергия Т-клеток также может возникать при стимуляции антигеном в отсутствие костимуляции, в результате чего клетка становится невосприимчивой к последующей активации антигеном даже в контексте костимуляции. Состояние невосприимчивости часто может быть преодолено присутствием IL2. Анергические Т-клетки не подвергаются клональной экспансии и/или не приобретают эффекторные функции.

Термин «истощение», используемый в настоящем описании, относится к истощению иммунных клеток, такому как истощение Т-клеток, т.е. состоянию дисфункции Т-клеток, которое возникает из-за устойчивой передачи сигналов TCR, которая возникает во время многих хронических инфекций и онкологического заболевания. Истощение отличается от анергии тем, что возникает не из-за неполной или недостаточной передачи сигналов, а из-за долгой передачи сигналов. Истощение определяется плохой эффекторной функцией, устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов и состоянием транскрипции, отличным от состояния функциональных эффекторных клеток или Т-клеток памяти. Истощение препятствует оптимальному контролю заболеваний (например, инфекций и опухолей). Истощение может быть результатом как внешних отрицательных регуляторных путей (например, иммунорегуляторных цитокинов), так и внутренних отрицательных регуляторных путей клеток (ингибирующих путей иммунных контрольных точек, таких как описанные в настоящей заявке).

«Усиление функции Т-клеток» означает способность индуцировать, побуждать или стимулировать Т-клетки таким образом, чтобы они имели устойчивую или усиленную биологическую функцию, или способность обновлять или реактивировать истощенные или неактивные Т-клетки. Примеры усиления функции Т-клеток включают повышенную секрецию γ -интерферона CD8⁺ Т-клетками, повышенную пролиферацию, повышенную чувствительность к антигенам (например, клиренс опухоли) по сравнению с такими уровнями до вмешательства. В одном воплощении уровень улучшения составляет по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200% или более. Способы измерения этого улучшения известны специалистам в данной области.

Ингибитор иммунной контрольной точки может представлять собой молекулу ингибирующей нуклеиновой кислоты. Термин «ингибирующая нуклеиновая кислота» или «молекула ингибирующей нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем описании, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, например, ДНК или РНК, которая полностью или частично уменьшает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует один или несколько белков контрольных точек. Молекулы ингибирующих нуклеиновых кислот включают, без ограничения указанным, олигонуклеотиды, миРНК (малые интерферирующие РНК), shРНК (малые РНК, образующие шпильки), молекулы антисмысловой ДНК или РНК и аптамеры (например, аптамеры ДНК или РНК).

Термин «олигонуклеотид», используемый в настоящем описании, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна снижать экспрессию белка, в частности, экспрессию белка контрольной точки, такого как белки контрольной точки, описанные в настоящей заявке. Олигонуклеотиды представляют собой короткие молекулы ДНК или РНК, обычно содержащие от 2 до 50 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Олигонуклеотид-ингибитор контрольной точки может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид. Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой молекулы одноцепочечной ДНК или РНК, комплементарные заданной последовательности, в частности последовательности нуклеиновой кислоты (или ее фрагмента) белка контрольной точки. Антисмысловая РНК обычно используется для предотвращения трансляции белка с мРНК, например, с мРНК, кодирующей белок контрольной точки, путем связывания с указанной мРНК. Антисмысловая ДНК обычно используется для направленного воздействия на специфическую комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. Если связывание имеет место, такой гибрид ДНК/РНК может быть расщеплен ферментом РНКазой H. Более того, антисмысловые морфолиновые олигонуклеотиды могут быть использованы для нокдаунов генов у позвоночных. Например, Kryczek et al., 2006 (J Exp Med, 203:871-81) сконструировали В7-Н4-специфические морфолиновые олигонуклеотиды, которые специфически блокировали экспрессию В7-Н4 в макрофагах, что приводило к увеличению пролиферации Т-клеток и уменьшению объемов опухолей у мышей с Т-клетками, специфичными к опухолеассоциированному антигену (ОАА).

Термины «миРНК» или «малая интерферирующая РНК» или «малая ингибирующая РНК» используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к двухцепочечной молекуле РНК с типичной длиной 20-25 пар оснований, которая препятствует экспрессии определенного гена, такого как как ген, кодирующий белок контрольной точки, с комплементарной последовательностью нуклеотидов. В одном

воплощении миРНК взаимодействует с мРНК, блокируя, таким образом, трансляцию, например, трансляцию белка иммунной контрольной точки. Трансфекцию экзогенной миРНК можно использовать для нокдауна гена, однако эффект может быть только временным, особенно в быстро делящихся клетках. Стабильная трансфекция может быть достигнута, например, путем модификации РНК или с использованием экспрессирующего вектора. Полезные модификации и векторы для стабильной трансфекции клеток миРНК известны в данной области. Последовательности миРНК также могут быть модифицированы для введения короткой петли между двумя цепями, что дает «малую РНК, образующую шпильки» или «shРНК». ShРНК может быть преобразована в функциональную миРНК с помощью Dicer. ShРНК имеет относительно низкую скорость деградации и оборота. Соответственно, ингибитор иммунной контрольной точки может представлять собой shРНК.

Термин «аптамер», используемый в настоящем описании, относится к одноцепочечной молекуле нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, обычно длиной 25-70 нуклеотидов, которая способна связываться с молекулой-мишенью, такой как полипептид. В одном воплощении аптамер связывается с белком иммунной контрольной точки, таким как белки контрольных точек иммунного ответа, описанные в настоящем документе. Например, аптамер в соответствии с изобретением может специфически связываться с белком или полипептидом иммунной контрольной точки или с молекулой в сигнальном пути, который модулирует экспрессию белка или полипептида иммунной контрольной точки. Получение и терапевтическое применение аптамеров хорошо известно в данной области (см., например, патент США 5 475 096).

Термины «низкомолекулярный ингибитор» или «малая молекула» используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к органическому соединению с низкой молекулярной массой, обычно до 1000 дальтон, которое полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или отрицательно модулирует один или несколько белков контрольных точек, как описано выше. Такие низкомолекулярные ингибиторы обычно синтезируются с помощью методов органической химии, но их также можно выделить из природных источников, таких как растения, грибы и микробы. Небольшая молекулярная масса позволяет низкомолекулярным ингибиторам быстро диффундировать через клеточные мембраны. Например, различные антагонисты A2AR, известные в данной области, представляют собой органические соединения с молекулярной массой менее 500 дальтон.

Ингибитором иммунной контрольной точки может быть антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, аналог антитела или гибридный белок, содержащий часть

антитела с антигенсвязывающим фрагментом требуемой специфичности. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты являются такими, как описано в настоящей заявке. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые являются ингибиторами иммунных контрольных точек, включают, в частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с белками иммунных контрольных точек, такими как рецепторы иммунных контрольных точек или лиганды иммунных контрольных точек. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с дополнительными фрагментами, как описано в настоящей заявке. В частности, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой химеризированные, гуманизированные или человеческие антитела. Предпочтительно, антитела-ингибиторы иммунных контрольных точек или их антигенсвязывающие фрагменты являются антагонистами иммунных контрольных рецепторов или лигандов иммунных контрольных рецепторов.

В предпочтительном воплощении антитело, которое представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки, представляет собой выделенное антитело.

Антитело, которое представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, также может представлять собой антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание антигена с любым известным антителом-ингибитором иммунной контрольной точки. В некоторых воплощениях антитело-ингибитор иммунной контрольной точки перекрестно конкурирует с одним или несколькими антителами-ингибиторами иммунной контрольной точки, описанными в настоящей заявке. Способность антител к перекрестной конкуренции за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела могут связываться с одной и той же эпитопной областью антигена или при связывании с другим эпитопом стерически препятствовать связыванию известных антител-ингибиторов иммунной контрольной точки с этой конкретной эпитопной областью. Эти перекрестно конкурирующие антитела могут иметь функциональные свойства, очень похожие на те, с которыми они перекрестно конкурируют, поскольку ожидается, что они будут блокировать связывание иммунной контрольной точки со своим лигандом либо путем связывания с тем же эпитопом, либо путем стерического препятствия связыванию лиганда. Перекрестно-конкурирующие антитела можно легко идентифицировать на основании их способности к перекрестной конкуренции с одним или несколькими известными антителами в стандартных анализах связывания, таких как анализ поверхностного плазмонного резонанса, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые перекрестно конкурируют за связывание с данным антигеном или связываются с той же эпитопной областью данного антигена, что и одно или несколько известных антител, представляют собой моноклональные антитела. Для введения пациентам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела могут быть химерными антителами или гуманизированными или человеческими антителами. Такие химерные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела могут быть получены и выделены способами, хорошо известными в данной области.

Ингибитор контрольной точки также может быть в растворимой молекулярной форме (или в растворимой форме вариантов молекул), например, в форме растворимого PD-L1 или слитого белка PD-L1.

В некоторых воплощениях ингибирующий иммунорегулятор (блокатор иммунных контрольных точек) является компонентом сигнального пути PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2. Соответственно, воплощения изобретения предусматривают введение субъекту ингибитора контрольной точки сигнального пути PD-1. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки сигнального пути PD-1 представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки сигнального пути PD-1 представляет собой ингибитор лиганда PD-1, такой как ингибитор PD-L1 или ингибитор PD-L2. В предпочтительном воплощении ингибитор контрольной точки сигнального пути PD-1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые нарушают взаимодействие между рецептором PD-1 и одним или несколькими его лигандами, PD-L1 и/или PD-L2. В данной области известны антитела, которые связываются с PD-1 и нарушают взаимодействие между PD-1 и одним или несколькими его лигандами. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PD-1. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, тем самым повышая иммунную активность. В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с PD-L2 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, тем самым повышая иммунную активность.

Типичные ингибиторы PD-1 включают, без ограничения указанным, анти-PD-1 антитела, такие как BGB-A317 (BeiGene; см. ламбролизумаб (например, раскрытый как hPD109A и его гуманизированные производные h409A1, h409A16 и h409A17 в WO 2008/156712), AB137132 (Abcam), EH12.2H7 и RMP1-14 (#BE0146; Bioxcell Lifesciences Pvt. LTD.), M1H4 (Affymetrix eBioscience), ниволумаб (OPDIVO, BMS-936558; Bristol

Myers Squibb; см. WO 2006/121168), пембролизумаб (KEYTRUDA; МК-3475; Merck; см. WO 2008/156712), пидилизумаб (CT- 011; CureTech; см. Hardy et al., 1994, Cancer Res., 54(22):5793-6 и WO 2009/101611), PDR001 (Novartis; см. WO 2015/112900), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca; см. WO 2012/145493), TSR-042 (см. WO 2014/179664), REGN-2810 (H4H7798N; см. US 2015/0203579), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; см. Si-Yang Liu et al., 2007, J. Hematol. Oncol. 70: 136), AMP-224 (GSK-2661380; см. Li et al., 2016, Int J Mol Sci 17(7):1151 и WO 2010/027827 и WO 2011/066342), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (BeiGene; см. WO 2015/35606 и US 2015. /0079109), BI 754091, SHR-1210 (см. WO2015/085847) и антитела 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, как описано в WO 2006/121168, INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; также известно как SHR- 1210; см. WO 2015/085847), TSR-042 (Tesarо Biopharmaceutical; также известно как ANB011; см. W02014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; также известно как WBP3055; см. Si-Yang et al., 2017, J. Hematol. Oncol. 70: 136), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; см. WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; см. WO 2017/040790), MGA012 (Macrogenics; см. WO 2017/19846), IBI308 (Innovent; см. WO 2017/024465), WO 2017/025016, WO 2017/132825 и WO 2017/133540), анти-PD-1 антитела, как описано, например, в US 7488802, US 8008449, US 8168757, WO 03/042402, WO 2010/089411 (дополнительно раскрывается анти-PD-L1 антитело), WO 2010/036959, WO 2011/159877 (дополнительно раскрывается анти-TIM-3 антитело), WO 2011/082400, WO 2011/161699, WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009 /114335, WO 2012/145493 (дополнительно раскрывается анти-PD-L1 антитело), WO 2015/035606, WO 2014/055648 (дополнительно раскрывается анти-KIR антитело), US 2018/0185482 (дополнительно раскрывается анти-PD-L1 и анти-TIGIT антитела), US 8008449, US 8779105, US 6808710, US 8168757, US 2016/0272708 и US 8354509, низкомолекулярные антагонисты сигнального пути PD-1, как описано, например, в Shaabani et al., 2018, Expert Op Ther Pat., 28(9):665-678 и Sasikumar and Ramachandra, 2018, BioDrugs, 32(5):481-497, миРНК, направленные на PD-1, как описано, например, в WO 2019/000146 и WO 2018/103501, растворимые белки PD-1, как описано в WO 2018/ 222711 и онколитические вирусы, содержащие растворимую форму PD-1, как описано, например, в WO 2018/022831.

В определенном воплощении ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб (OPDIVO; BMS-936558), пембролизумаб (KEYTRUDA; МК-3475), пидилизумаб (CT-011), PDR001, MEDI0680 (AMP-514), TSR-042, REGN2810, JS001, AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, BGB-A317, BI 754091 или SHR-1210.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб (регистрационный номер CAS: 1374853-91-4). Пембролизумаб (Merck), также известный

как МК-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO2009/114335. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, где:

(a) тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF

NEFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW
GQGTTVTVSS

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS

GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
APEFLGGPSV

FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTY

RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK

NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL
TVDKSRWQEG

NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 53) и

(b) легкая цепь включает аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
LIYLAAYLES

GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI
KRTVAAPSVF

IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
DSKDSTYSLS

STLTLSKADY ENKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 54).

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает шесть последовательностей CDR из SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 (например, три CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO: 53 и три CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 54). В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 53 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 54. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и (b) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает: (a) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR-1, содержащий аминокислотную последовательность GYTFTNYY (SEQ ID NO: 57), CDR-2, содержащий аминокислотную последовательность INPSNGGT (SEQ ID NO: 58) и CDR-3, содержащий аминокислотную последовательность ARRDYRFDMGFDY (SEQ ID NO: 59), и (b) переменную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR-1, содержащий аминокислотную последовательность KGVSTSGYSY (SEQ ID NO: 60), CDR-2, содержащий аминокислотную последовательность LAS (SEQ ID NO: 61), и CDR-3, содержащий аминокислотную последовательность QHSRDLPLT (SEQ ID NO: 62).

В определенном воплощении анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб, который можно вводить в дозе 200 мг внутривенно. Пембролизумаб можно вводить внутривенно в соответствии с институциональными рекомендациями, опубликованными рекомендациями и информацией о назначении соответствующего продукта, а также дозировать его в соответствии с этим назначением.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4). Ниволумаб (Bristol-Myers Squibb/Ono), также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO®, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO2006/121168. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает последовательность тяжелой цепи и легкой цепи, где:

(a) тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность:

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY

ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGLT
VTSASTKGPS

VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYPPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL
QSSGLYSLSS

VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG
PSVFLFPPKP

KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
STYRVVSVLT

VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE
MTKNQVSLTC

LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW
QEGNVFSCSV

MHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 63) и

(b) легкая цепь включает аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA

RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV
AAPSVFIFPP

SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD
STYLSSTLT

LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 64).

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает шесть последовательностей CDR из SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 (например, три CDR тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и три CDR легкой цепи из SEQ ID NO: 64). В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 63 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 64. В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает: переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (b) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело включает: (a) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит CDR-1, содержащий аминокислотную последовательность GITFSNSG (SEQ ID NO: 67), CDR-2, содержащий аминокислотную последовательность IWYDGSKR (SEQ ID NO: 68) и CDR-3, содержащий аминокислотную последовательность ATNDDY (SEQ ID NO: 69), и (b) переменную область легкой цепи (VL), которая содержит CDR-1 содержащий аминокислотную последовательность QSVSSY (SEQ ID NO: 70), CDR-2, содержащий аминокислотную последовательность DAS (SEQ ID NO: 71), и CDR-3, содержащий аминокислотную последовательность QQSSNWPR (SEQ ID NO :72).

В определенном воплощении анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб, который можно вводить в дозе 240 мг внутривенно. Ниволумаб можно вводить внутривенно в соответствии с институциональными рекомендациями, опубликованными рекомендациями и соответствующей информацией о назначении продукта, а также дозировать его в соответствии с этим назначением.

Лиганд запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) представляет собой белок, который взаимодействует с белком запрограммированной гибели 1 (PD-1) и экспрессируется, например, на иммунных и опухолевых клетках. В некоторых воплощениях субъект, подлежащий лечению, имеет рак, характеризующийся экспрессией

PD-L1. В некоторых воплощениях образец, полученный из организма субъекта, страдающего раком, характеризуется экспрессией PD-L1. В некоторых воплощениях экспрессию PD-L1 определяют с помощью иммуногистохимии (ИГХ).

В некоторых воплощениях экспрессия PD-L1 выражается в виде комбинированного положительного показателя (КПП). Комбинированный положительный показатель (КПП) образца можно определить путем деления количества клеток, положительно окрашенных на PD-L1 (опухолевых клеток, лимфоцитов и макрофагов), на общее количество жизнеспособных опухолевых клеток, а затем умножения на 100. В некоторых воплощениях комбинированная положительная оценка (КПП) относится к отношению количества PD-L1-положительных опухолевых клеток и PD-L1-положительных мононуклеарных воспалительных клеток (MIS) в опухолевых гнездах и прилегающей поддерживающей строме (числитель), поделенному на общее количество опухолевых клеток (знаменатель, то есть количество PD-L1-положительных и PD-L1-отрицательных опухолевых клеток), а затем умноженному на 100. Экспрессию PD-L1 любой интенсивности можно считать положительной, т.е. слабой (1+), умеренной (2+) или сильной (3+).

В некоторых воплощениях образец, экспрессирующий PD-L1, имеет КПП по меньшей мере около 1 (т.е. $\text{КПП} \geq 1$). В некоторых воплощениях образец, экспрессирующий PD-L1, имеет КПП по меньшей мере около 5 (т.е. $\text{КПП} \geq 5$). В некоторых воплощениях образец, экспрессирующий PD-L1, имеет КПП по меньшей мере около 10 (т.е. $\text{КПП} \geq 10$).

Типичные ингибиторы лиганда PD-1 представляют собой ингибиторы PD-L1 и ингибиторы PD-L2 и включают, без ограничения указанным, анти-PD-L1 антитела, такие как MEDI4736 (дурвалумаб; AstraZeneca; см. WO 2011/066389), MSB-0010718C (см. US 2014/0341917), YW243.55.S70 (см. SEQ ID NO: 20 в WO 2010/077634 и US 8217149), MHN1 (Affymetrix eBioscience; см. EP 3 230 319), MDX-1105 (Roche/Genentech; см. WO 2013019906 и US 8,217,149) STI-1014 (Sorrento; см. W02013/181634), CK-301 (Checkpoint Therapeutics), KN035 (3D Med/Alphamab; см. Zhang et al., 2017, Cell Discov. 3:17004), атезолизумаб (TECENTRIQ; RG7446; MPDL3280A; R05541267; см. US 9 724 413), BMS-936559 (Bristol Myers Squibb; см. US 7 943 743, WO 2013/173223), авелумаб (bavencio; см. US 2014/0341917), LY3300054 (Eli Lilly Co.), CX-072 (Proclaim-CX-072; также называется CytomX; см. WO2016/149201), FAZ053, KN035 (см. 2015/0320859), анти-PD-L1 антитела, описанные в US 7943743, включая 3G10, 12A4 (также называемые BMS-936559), 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, анти-PD-L1 антитела, описанные в WO 2010/077634, US 8,217,149, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2011/066342, US

8,217,149, US 7 943 743, WO 2010/089411, US 7 635 757, US 8 217 149, US 2009/0317368, WO 2011/066389, WO2017/034916, WO2017/020291, WO2017/020858, WO2017/020801, WO2016/111645, WO2016/197367, WO2016/061142, WO2016/149201, WO2016/000619, WO2016/160792, WO2016/022630, WO2016/007235, WO2015/ 179654, WO2015/173267, WO2015/181342, WO2015/109124, WO 2018/222711, WO2015/112805, WO2015/061668, WO2014/159562, WO2014/165082, WO2014/100079.

Ингибиторы контрольных точек можно вводить любым способом и любым путем, известным в данной области. Способ и путь введения будут зависеть от типа используемого ингибитора контрольной точки.

Ингибиторы контрольных точек можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции, как описано в данной заявке.

Ингибиторы контрольных точек можно вводить в форме нуклеиновой кислоты, такой как молекулы ДНК или РНК, кодирующие ингибитор иммунной контрольной точки, например, молекулу ингибиторной нуклеиновой кислоты или антитело или его фрагмент. Например, антитела могут быть доставлены закодированными в экспрессирующих векторах, как описано в настоящей заявке. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены как таковые, например, в форме плазмиды или молекулы мРНК или в виде комплекса с носителем для доставки, например липосомой, липоплексом или липидными частицами нуклеиновой кислоты. Ингибиторы контрольных точек можно также вводить посредством онколитического вируса, содержащего экспрессирующую кассету, кодирующую ингибитор контрольных точек. Ингибиторы контрольных точек также можно доставлять путем введения эндогенных или аллогенных клеток, способных экспрессировать ингибитор контрольных точек, например, на основе клеточной терапии.

Термин «клеточная терапия» относится к трансплантации клеток (например, Т-лимфоцитов, дендритных клеток или стволовых клеток), экспрессирующих ингибитор иммунной контрольной точки, субъекту с целью лечения заболевания или расстройства (например, онкологического заболевания). В одном воплощении клеточная терапия включает генно-инженерные клетки. В одном воплощении генетически сконструированные клетки экспрессируют ингибитор иммунной контрольной точки, такой как описанный в настоящей заявке. В другом воплощении генетически сконструированные клетки экспрессируют ингибитор иммунной контрольной точки, который представляет собой молекулу ингибиторной нуклеиновой кислоты, такую как мРНК, shРНК, олигонуклеотид, антисмысловая ДНК или РНК, аптамер, антитело или его фрагмент или растворимый белок иммунной контрольной точки или слитый белок. Генетически модифицированные клетки могут также экспрессировать дополнительные

агенты, усиливающие функцию Т-клеток. Такие агенты известны в данной области. Клеточная терапия для применения при ингибировании передачи сигналов иммунных контрольных точек раскрыта, например, в заявке WO 2018/222711, которая полностью включена в данную заявку в качестве ссылки.

Термин «онколитический вирус», используемый в настоящем описании, относится к вирусу, способному избирательно реплицироваться и замедлять рост или индуцировать гибель озлокачествленной или гиперпролиферативной клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*, при этом не оказывая влияния на нормальные клетки или оказывая на них минимальное влияние. Онколитический вирус для доставки ингибитора иммунной контрольной точки содержит экспрессирующую кассету, которая может кодировать ингибитор иммунной контрольной точки, представляющий собой молекулу ингибиторной нуклеиновой кислоты, такую как миРНК, shРНК, олигонуклеотид, антисмысловая ДНК или РНК, аптамер, антитело или его фрагмент или растворимый белок иммунной контрольной точки или белок слияния. Онколитический вирус предпочтительно является компетентным по репликации, а экспрессирующая кассета находится под контролем вирусного промотора, например, синтетического раннего/позднего промотора поксвируса. Примеры онколитических вирусов включают вирус везикулярного стоматита (VSV), рабдовирусы (например, пикорнавирусы, такие как вирус долины Сенека; SVV-001), вирус Коксаки, парвовирус, вирус болезни Ньюкасла (NDV), вирус простого герпеса (HSV; OncoVEX GMCSF), ретровирусы (например, вирусы гриппа), вирус кори, реовирус, вирус Синдбис, вирус осповакцины, как описано в качестве примера в WO 2017/209053 (включая штаммы Copenhagen, Western Reserve, Wyeth), и аденовирус (например, Delta-24, Delta-24-RGD), ICOVIR-5, ICOVIR-7, Onyx-015, ColoAd1, H101, AD5/3-D24-GMCSF). Создание рекомбинантных онколитических вирусов, содержащих растворимую форму ингибитора иммунных контрольных точек, и способы их применения раскрыты в заявке WO 2018/022831, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Онколитические вирусы могут быть использованы в качестве аттенуированных вирусов.

Как описано в настоящей заявке, анти-CLDN18.2 антитело вводят вместе, т.е. совместно, с ингибитором контрольной точки субъекту, например, пациенту. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки и анти-CLDN18.2 антитело вводят субъекту в виде единой композиции. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки и анти-CLDN18.2 антитело вводят субъекту одновременно (в виде отдельных композиций в одно и то же время). В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки и анти-CLDN18.2 антитело вводят субъекту по отдельности. В некоторых воплощениях

ингибитор контрольной точки вводят субъекту перед введением анти-CLDN18.2 антитела. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки вводят субъекту после введения анти-CLDN18.2 антитела. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки и анти-CLDN18.2 антитело вводят субъекту в один и тот же день. В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки и анти-CLDN18.2 антитело вводят субъекту в разные дни.

Согласно изобретению, термин «химиотерапевтическое средство» включает цитотоксические средства, цитостатические средства или их комбинации. Химиотерапевтические агенты могут воздействовать на клетки одним из следующих способов: (1) повреждать ДНК клеток, так что они больше не могут воспроизводиться, (2) ингибировать синтез новых нитей ДНК, так что репликация клеток становится невозможной, (3) останавливать митотические процессы клеток, так что клетки не могут делиться на две клетки. Химиотерапевтический агент может представлять собой агент, стабилизирующий или повышающий экспрессию CLDN18.2.

Термин «агент, стабилизирующий или повышающий экспрессию CLDN18.2», относится к агенту или комбинации агентов, введение которых в клетки приводит к повышению уровня РНК и/или белка CLDN18.2, предпочтительно к повышению уровня белка CLDN18.2 на клеточной поверхности по сравнению с ситуацией, когда клетки не обрабатываются агентом или комбинацией агентов. Предпочтительно клетка представляет собой клетку рака, в частности клетку рака, экспрессирующую CLDN18.2, такую как клетка раскрытых в настоящем описании типов рака. Термин «агент, стабилизирующий или повышающий экспрессию CLDN18.2» относится, в частности, к агенту или комбинации агентов, введение которых в клетки приводит к более высокой плотности CLDN18.2 на поверхности указанных клеток по сравнению с ситуацией, когда клетки не обработаны агентом или комбинацией агентов. «Стабилизирующий экспрессию CLDN18.2» включает, в частности, ситуацию, когда агент или комбинация агентов предотвращает снижение или уменьшает снижение экспрессии CLDN18.2, например, экспрессия CLDN18.2 снижалась бы без предоставления агента или комбинации агентов и предоставление агента или комбинации агентов предотвращает указанное снижение или уменьшает указанное снижение экспрессии CLDN18.2. «Повышение экспрессии CLDN18.2» включает, в частности, ситуацию, когда агент или комбинация агентов повышают экспрессию CLDN18.2, например, экспрессия CLDN18.2 будет снижаться, оставаться по существу постоянной или повышаться без введения агента или комбинации агентов и предоставление агента или комбинация агентов повышает экспрессию CLDN18.2 по сравнению с ситуацией без предоставления агента или комбинации агентов,

так что результирующая экспрессия является более высокой по сравнению с ситуацией, когда экспрессия CLDN18.2 будет уменьшаться, оставаться практически постоянным или повышаться без предоставления агента или комбинации агентов.

Согласно изобретению термин «агент, стабилизирующий или повышающий экспрессию CLDN18.2» предпочтительно относится к агенту или комбинации агентов, такому как цитостатическое соединение или комбинация цитостатических соединений, обработка которыми клеток, в частности клеток рака, приводит к задержке или накоплению клеток на одной или нескольких фазах клеточного цикла, предпочтительно на одной или нескольких фазах клеточного цикла, кроме фаз G1 и G0, предпочтительно не на фазе G1, предпочтительно на одной или более из числа G2- или S-фаз клеточного цикла, таких как G1/G2-, S/G2-, G2- или S-фаза клеточного цикла. Термин «клетки, остановленные или накапливающиеся на одной или нескольких фазах клеточного цикла» означает, что процент клеток, находящихся на указанной одной или нескольких фазах клеточного цикла, увеличивается. Каждая клетка, чтобы воспроизвести себя, проходит цикл, состоящий из четырех фаз. Первая фаза, называемая G1, представляет собой фазу, на которой клетка готовится к репликации своих хромосом. Вторая стадия называется S, и на этой фазе происходит синтез ДНК и удвоение ДНК. Следующей фазой является фаза G2, когда происходит синтез РНК и белков. Заключительная стадия — это стадия M, которая представляет собой стадию фактического деления клеток. На этой последней стадии удвоенная ДНК и РНК расщепляются и перемещаются к разным концам клетки, и клетка фактически делится на две идентичные функциональные клетки. Химиотерапевтические агенты, которые являются агентами, повреждающими ДНК, обычно приводят к накоплению клеток в фазе G1 и/или G2. Химиотерапевтические агенты, которые блокируют рост клеток, препятствуя синтезу ДНК, такие как антиметаболиты, обычно приводят к накоплению клеток в S-фазе. Примерами этих лекарственных средств являются 6-меркаптопурин и 5-фторурацил.

Согласно изобретению термин «агент, стабилизирующий или повышающий экспрессию CLDN18.2», включает соединения платины, такие как оксалиплатин и цисплатин, и аналоги нуклеозидов, такие как 5-фторурацил или его пролекарства, и комбинации лекарственных средств, такие как комбинации лекарственных средств, содержащие оксалиплатин и 5-фторурацил.

В одном предпочтительном воплощении «химиотерапевтический агент» представляет собой «агент, индуцирующий иммуногенную гибель клеток».

В определенных обстоятельствах клетки рака могут вступить в летальный стрессовый путь, связанный с запуском пространственно-временной определенной

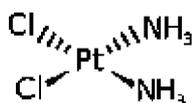
комбинации сигналов, которые расшифровываются иммунной системой для активации опухолеспецифических иммунных ответов (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798–804). В таком сценарии клетки рака индуцируются для испускания сигналов, которые воспринимаются эффекторами врожденного иммунитета, такими как дендритные клетки, для включения когнатного иммунного ответа, который включает CD8+ Т-клетки и передачу сигналов IFN- γ , так что гибель опухолевых клеток может вызвать продуктивный противоопухолевый иммунный ответ. Эти сигналы включают преапоптотическое воздействие шаперона кальретикулина (CRT) эндоплазматического ретикулума (ER) на клеточную поверхность, преапоптотическую секрецию АТФ и постапоптотическое высвобождение ядерного белка HMGB1. Вместе эти процессы составляют молекулярные детерминанты иммуногенной гибели клеток (ИГК). Антрациклины, оксалиплатин и гамма-облучение способны индуцировать все сигналы, определяющие ИГК, в то время как цисплатин, например, недостаточный для индукции транслокации CRT из ЭР на поверхность погибающих клеток (процесс, требующий стресса ЭР), нуждается в комплементации тапсигаргином, индуктором стресса ЭР.

В соответствии с изобретением термин «агент, индуцирующий иммуногенную гибель клеток» относится к агенту или комбинации агентов, которые при воздействии на клетки, в частности клетки рака, способны индуцировать клетки к вступлению на путь летального стресса, который в конечном итоге приводит к опухолеспецифическим иммунным реакциям. В частности, агент, индуцирующий иммуногенную гибель клеток, при введении в клетки побуждает клетки запускать пространственно-временную комбинацию сигналов, включая, в частности, преапоптотическое воздействие шаперона кальретикулина (CRT) эндоплазматического ретикулума (ЭР) на клеточную поверхность, преапоптотическую секрецию АТФ и постапоптотическое высвобождение ядерного белка HMGB1.

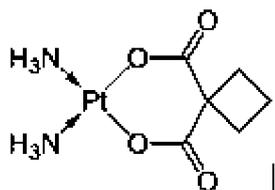
Согласно изобретению, термин «агент, индуцирующий иммуногенную гибель клеток» включает оксалиплатин.

Согласно изобретению, термин «соединение платины» относится к соединениям, содержащим платину в своей структуре, таким как комплексы платины. В частности, этот термин относится к таким соединениям, которые используются в химиотерапии на основе платины, и включает такие соединения, как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

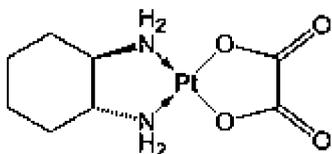
Термин «цисплатин» или «цисплатина» относится к соединению цис-диамминдихлорплатины (II) (ЦДДП) следующей формулы:



Термин «карбоплатин» относится к соединению цис-диаммин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платины (II) следующей формулы:



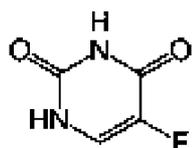
Термин «оксалиплатин» относится к соединению, которое представляет собой соединение платины, образующее комплекс с диаминоциклогексановым лигандом-носителем следующей формулы:



В частности, термин «оксалиплатин» относится к соединению [(1R,2R)-циклогексан-1,2-диамин](этандиоато-О,О')платины (II). Оксалиплатин для инъекций также продается под торговой маркой Элоксатин.

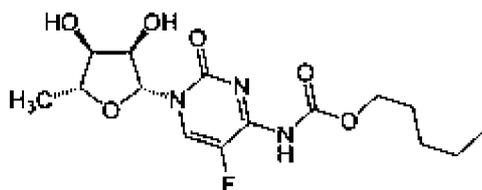
Термин «аналог нуклеозида» относится к структурному аналогу нуклеозида, категории, которая включает как пуриновые аналоги, так и пиримидиновые аналоги. В частности, термин «аналог нуклеозида» относится к таким соединениям, которые используются в антиметаболической химиотерапии, и включает производные фторпиримидина и их предшественники, которые включают фторурацил и его пролекарства, включая, без ограничения указанным, фторурацил (5-ФУ), капецитабин, флоксуридин и тегафур. Термин «антиметаболическая химиотерапия» относится к применению агента, который структурно подобен метаболиту, но не может продуктивно использоваться организмом. В некоторых воплощениях антиметаболическая химиотерапия препятствует продукции нуклеиновых кислот, РНК и ДНК.

Термин «фторурацил» или «5-фторурацил» (5-FU или f5U) (продается под торговыми марками Adrucil, Carac, Efudix, Efudex и Fluoroplex) представляет собой соединение, которое представляет собой аналог пиримидина следующей формулы:



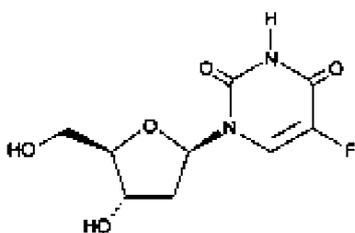
В частности, термин относится к соединению 5-фтор-1Н-пиримидин-2,4-дион.

Термин «капецитабин» (Xeloda, Roche) относится к химиотерапевтическому средству, представляющему собой пролекарство, которое в тканях превращается в 5-ФУ. Капецитабин, который можно вводить перорально, имеет следующую формулу:

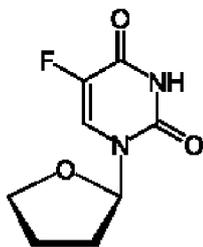


В частности, термин относится к соединению пентил[1-(3,4-дигидрокси-5-метилтетрагидрофуран-2-ил)-5-фтор-2-оксо-1Н-пиримидин-4-ил]карбамат.

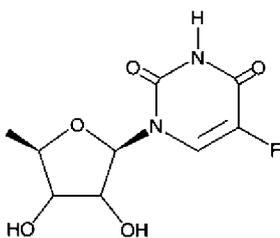
«Флоксуридин» (5-фтордезоксифлуридин) — онкологическое лекарственное средство, которое быстро катаболизируется до 5-фторурацила, являющегося активной формой лекарственного средства. Флоксуридин имеет следующую формулу:



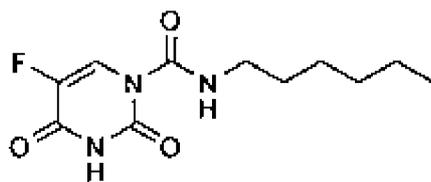
«Тегафур» (5-фтор-1-(оксолан-2-ил)пиримидин-2,4-дион) является химиотерапевтическим пролекарством 5-фторурацила. При метаболизме превращается в 5-фторурацил. Тегафур имеет следующую формулу:



Термин «доксифлуридин» (5'-дезоксифлуридин) представляет собой фторпиримидиновое производное 5-фторурацила. Это пролекарство-аналог нуклеозида второго поколения используется в качестве цитостатического агента при химиотерапии в некоторых странах Азии, включая Китай и Южную Корею. Внутри клетки пиримидиннуклеозидфосфорилаза или тимидинфосфорилаза могут метаболизировать доксифлуридин в 5-фторурацил. Доксифлуридин также является метаболитом капецитабина. Доксифлуридин, который можно вводить перорально, имеет следующую формулу:



Термин «Кармофур» (INN) или «НСFU» относится к 1-гексилкарбамоил-5-фторурацилу:



Это соединение является аналогом пириимидина, используемым в качестве противоопухолевого средства. Это производное фторурацила является липофильно экранированным аналогом 5-фторурацила. Попав внутрь клетки, пролекарство кармофур превращается в 5-фторурацил.

Настоящее изобретение может включать введение соединения платины и соединения фторпириимидина или его предшественника как часть химиотерапевтического режима, установленного при лечении онкологического заболевания. Такой химиотерапевтический режим может быть выбран из группы, состоящей из химиотерапии EOX, химиотерапии ECF, химиотерапии ECX, химиотерапии EOF, химиотерапии FLO, химиотерапии CAPOX, химиотерапии FOLFOX, химиотерапии DCF, химиотерапии SOX и химиотерапии FLOT.

Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии EOX, включает эпирубицин, оксалиплатин и капецитабин. Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии ECF, включает эпирубицин, цисплатин и 5-фторурацил. Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии ECX, включает эпирубицин, цисплатин и капецитабин. Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии EOF, включает эпирубицин, оксалиплатин и 5-фторурацил. Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии FLO, включает 5-фторурацил, фолиновую кислоту и оксалиплатин. Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии SOX, включает тегафур, гимерацил, отерацил и оксалиплатин.

FOLFOX представляет собой схему химиотерапии, состоящая из фолиновой кислоты (лейковорина), 5-фторурацила и оксалиплатина. Рекомендуемая схема введения доз каждые две недели выглядит следующим образом: День 1: оксалиплатин 85 мг/м² в/в инфузия и лейковорин 200 мг/м² в/в инфузия, затем 5-ФУ 400 мг/м² внутривенно болюсно, затем 5-ФУ 600 мг/м² внутривенная инфузия в виде 22-часовой непрерывной инфузии; День 2: Лейковорин 200 мг/м² в/в в течение 120 минут, затем 5-ФУ 400 мг/м² в/в болюсно в течение 2-4 минут, затем 5-ФУ 600 мг/м² в/в инфузия в течение 22 часов.

Существует несколько различных схем FOLFOX, отличающихся дозами и способами введения трех лекарственных средств.

В одном воплощении схема химиотерапии представляет собой модифицированную схему FOLFOX-6 (mFOLFOX6). В одном воплощении схема mFOLFOX6 включает 85 мг/м² оксалиплатина, 400 мг/м² болусно 5-ФУ и 400 мг/м² лейковорина с последующим введением 2400 мг/м² 5-ФУ в виде непрерывной инфузии.

В одном воплощении дозы и режимы введения при обработке mFOLFOX6 следующие:

Оксалиплатин 85 мг/м² в/в инфузия, например, 2-часовая в/в инфузия, например, 500 мл, одновременно с лейковорином 400 мг/м² (или лево-лейковорином [левофолинат или левофолиновая кислота] 200 мг/м²) в/в инфузией. Затем следует внутривенное болусное введение 5-ФУ 400 мг/м² (например, в течение 5–15 минут), а затем непрерывная инфузия 5-ФУ 2400 мг/м², например, в течение 46–48 часов.

mFOLFOX6 можно повторять каждые 2 недели [15 и 29 дни]. Цикл может включать 3 процедуры и может длиться 6 недель. В одном воплощении субъекты получают до 12 процедур mFOLFOX6 (4 цикла). Согласно настоящему изобретению, лечение mFOLFOX6 может следовать за введением анти-CLDN18.2 антитела и введением анти-PD-1 антитела.

В одном воплощении лечение, описанное в настоящей заявке, может включать следующее:

Нагрузочная доза анти-CLDN18.2 антитела 800 мг/м² (или 600 мг/м²) в комбинации с ниволумабом 240 мг и mFOLFOX6 в 1-й день 1-го цикла с последующим введением анти-CLDN18.2 антитела 400 мг/м² в комбинации с ниволумабом 240 мг и mFOLFOX6 каждые 2 недели [дни 15 и 29] (1 цикл = 6 недель). Сначала можно ввести анти-CLDN18.2 антитело, затем ниволумаб, а затем mFOLFOX6. В одном воплощении субъекты получают до 12 процедур mFOLFOX6 (4 цикла). Начиная с цикла 5, субъекты могут продолжать принимать 5-ФУ и лейковорин или фолиновую кислоту вместе с анти-CLDN18.2 антителом и ниволумабом. В одном воплощении ниволумаб вводят внутривенно, например, в течение 30 минут, в 1-й день каждого 2-недельного цикла, и это лекарственное средство вводят после завершения инфузии анти-CLDN18.2 антитела, например, через 1 час после завершения инфузии анти-CLDN18.2 антитела.

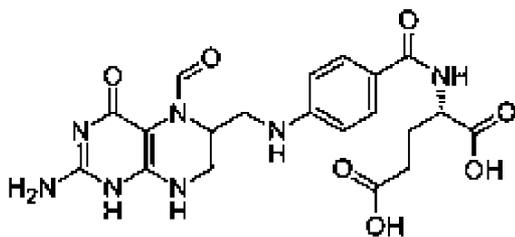
Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии CAPOX, включает капецитабин и оксалиплатин. Режим CAPOX работает 3-недельными циклами, обычно всего 8 циклов; капецитабин принимают перорально два раза в день в течение

двух недель, оксалиплатин вводят внутривенно в первый день цикла; есть недельный период отдыха перед следующим циклом.

Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии DCF, включает доцетаксел, цисплатин и 5-фторурацил.

Комбинация лекарственных средств, используемая при химиотерапии FLOT, включает доцетаксел, оксалиплатин, 5-фторурацил и фолиновую кислоту.

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



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

Термин «антиген» относится к агенту, такому как белок или пептид, содержащий эпитоп, против которого направлен и/или должен быть направлен иммунный ответ. В предпочтительном воплощении антиген представляет собой ассоциированный с опухолью антиген, такой как CLDN18.2, т.е. компонент клеток рака, который может происходить из цитоплазмы, клеточной поверхности и клеточного ядра. В частности, термин охватывает такие антигены, которые продуцируются, предпочтительно в большом количестве, внутриклеточно или в виде поверхностных антигенов на раковых клетках.

В контексте настоящего изобретения термин «опухолеассоциированный антиген» («ассоциированный с опухолью антиген») предпочтительно относится к белкам, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в ограниченном числе тканей и/или органов или на определенных стадиях развития и экспрессируются или aberrantly экспрессируются в одной или нескольких тканях опухоли и рака. В контексте настоящего изобретения ассоциированный с опухолью антиген предпочтительно связан с клеточной поверхностью клетки рака и предпочтительно не экспрессируется или редко экспрессируется в нормальных тканях.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте в молекуле, т.е. к той части молекулы, которая распознается иммунной системой, например, распознается антителом. Например, эпитопы представляют собой дискретные трехмерные участки на

антигене, которые распознаются иммунной системой. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, прекращается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп белка, такого как CLDN18.2, предпочтительно содержит непрерывную или прерывистую часть указанного белка и предпочтительно содержит от 5 до 100, предпочтительно от 5 до 50, более предпочтительно от 8 до 30, наиболее предпочтительно от 10 до 25 аминокислот в длину, например, длина эпитопа предпочтительно может составлять 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

Термин «антитело» относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, и включает любую молекулу, содержащую антигенсвязывающий фрагмент антитела. Термин «антитело» включает моноклональные антитела и фрагменты или производные антител, включая, без ограничения указанным, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, например, scFv и антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и Fab', а также включает все рекомбинантные формы антител, например, антитела, экспрессированные в прокариотах, негликозилированные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты и производные антител, как описано в настоящей заявке. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящей заявке как VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящей заявке как VL) и константной области легкой цепи. Области VH и VL могут быть далее разделены на гиперпеременные участки, называемыми участками, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Описанные в настоящей заявке антитела могут быть человеческими антителами. При использовании в данном описании, подразумевается, что термин «человеческое антитело» включает антитела, содержащие переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Антитела человека, описанные в настоящей заявке, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*).

Термин «гуманизированное антитело» относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий сайт, который, по существу, получен из иммуноглобулина, принадлежащего виду, отличному от человека, где остальная структура молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Сайт связывания антигена может содержать либо полные переменные области, слитые с константными областями, либо только участки, определяющие комплементарность (CDR), привитые на соответствующие каркасные участки переменных областей. Сайты связывания антигена могут быть сайтами дикого типа или модифицированными одной или несколькими аминокислотными заменами, например, модифицированными для более близкого сходства с иммуноглобулинами человека. Некоторые формы гуманизированных антител сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR мышинного антитела). Другие формы имеют один или несколько CDR, которые изменены по сравнению с исходным антителом.

Термин «химерное антитело» относится к таким антителам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей гомологична соответствующим последовательностям антител, происходящих из определенного вида или принадлежащих к определенному классу, в то время как остальная часть аминокислотной последовательности гомологична соответствующим последовательностям антител другого класса. Обычно переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных от одного вида млекопитающих, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител, полученных от другого вида. Одним явным преимуществом таких химерных форм является то, что переменная область может быть легко получена из известных в настоящее время источников с использованием легкодоступных В-клеток или гибридом из организмов-хозяев, отличных от человека, в сочетании с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток

человека. В то время как переменная область имеет преимущество в простоте получения, а специфичность не зависит от источника, константная область, принадлежащая человеку, с меньшей вероятностью вызовет иммунный ответ у субъекта-человека при введении антител, чем константная область из нечеловеческого источника. Однако указанный термин не ограничивается этим конкретным примером.

Термины «антигенсвязывающий участок» антитела (или просто «связывающий участок») или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «связывающий фрагмент») или аналогичные термины относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий участок» антитела, включают (i) фрагменты Fab, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) фрагменты F(ab')₂, двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), которые состоят из домена VH; (vi) отдельные участки, определяющие комплементарность (CDR), и (vii) комбинации двух или более отдельных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с помощью рекомбинантных способов, посредством синтетического линкера, который позволяет им создать отдельную белковую цепь, в которой области VL и VH сливаются для образования моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv) см. Bird et al., (1988) *Science* 242: 423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Другим примером являются слитые белки связывающего домена иммуноглобулина, содержащие (i) полипептид связывающего домена, который слит с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH₂ тяжелой цепи иммуноглобулина, которая слита с шарнирной областью, и (iii) константную область CH₃ тяжелой цепи иммуноглобулина, которая слита с константной областью CH₂. Полипептид связывающего домена может представлять собой переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. Слитые белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с помощью

традиционных методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на возможность использования так же, как и интактные антитела.

Предполагается, что термин «биспецифическая молекула» включает любой агент, например, белок, пептид или белковый или пептидный комплекс, который имеет две разные специфичности связывания. Например, молекула может связываться или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности и (b) рецептором Fc на поверхности эффекторной клетки. Предполагается, что термин «мультиспецифическая молекула» или «гетероспецифическая молекула» включает любой агент, например, белок, пептид или белковый или пептидный комплекс, который имеет более двух различных специфичностей связывания. Например, молекула может связываться или взаимодействовать с (а) антигеном клеточной поверхности, (b) рецептором Fc на поверхности эффекторной клетки и (с) по меньшей мере одним другим компонентом. Соответственно, изобретение включает, без ограничения указанным, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и другие мультиспецифические молекулы, которые направлены на CLDN18.2 и на другие мишени, такие как рецепторы Fc на эффекторных клетках. Термин «биспецифические антитела» также включает поливалентные антитела, такие как трехвалентные антитела с двумя различными специфичностями связывания, четырехвалентные антитела с двумя или тремя различными специфичностями связывания и т.д. Термин «биспецифические антитела» также включает диатела. Диатела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием слишком короткого линкера, который не позволяет спаривать два домена в одной цепи, тем самым вынуждая домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи с созданием двух антигенсвязывающих сайтов (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Антитело может быть конъюгировано с терапевтической молекулой или агентом, такими как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессант) или радиоизотоп. Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который вреден для клеток и, в частности, убивает их. Примеры включают майтансины (например, мертанзин, равтанзин или эмтансид), ауристатины (мометилауристатин F (MMAF), мометилауристатин E (MMAE)), майтансиноид (DM1 или DM4), доластатины, калихеамицины (например, озогамин), димеры пирролобензидиазепина (например, тезирин, таирин), дуокармицины (например, дуокармицин SA, CC-1065, дуокармазин) и α -аманитин, иринотекан или его производное SN-38, таксол, цитохалазин B, грамицидин D,

этидиум бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиоэпа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин). В предпочтительном воплощении терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент или радиотоксический агент. В другом воплощении терапевтический агент представляет собой иммуносупрессант. В еще одном воплощении терапевтический агент представляет собой GM-CSF. В предпочтительном воплощении терапевтический агент представляет собой доксорубицин, цисплатин, блеомицин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид или ризин А.

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

Конъюгаты антител по изобретению можно использовать для модификации заданного биологического ответа, и лекарственную составляющую не следует рассматривать как ограниченную классическими химическими терапевтическими агентами. Например, лекарственная составляющая может быть белком или полипептидом, обладающим требуемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, ризин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли или интерферон; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 («IL-1»), интерлейкин-2 («IL-2»), интерлейкин-6 («IL-6»), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор («GM-CSF»), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор («G-CSF») или другие факторы роста.

Методы конъюгирования терапевтических молекул с антителами хорошо известны (см., например, Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp.

243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery», in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

В настоящем описании термин «антитело происходит» из конкретной последовательности зародышевой линии используется в том случае, если антитело получено путем иммунизации животного или путем скрининга геной библиотеки иммуноглобулинов, причем аминокислотная последовательность отобранного антитела по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, антитело, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии, будет отличаться не более чем на 10 аминокислот, более предпочтительно будет отличаться не более чем на 5 или еще более предпочтительно не более чем на 4, 3, 2 или 1 аминокислоту от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Используемый в настоящем описании термин «гетероантитела» относится к двум или более антителам, их производным или антигенсвязывающим участкам, соединенным вместе, по меньшей мере два из которых обладают различной специфичностью. Эти различные специфичности включают специфичность связывания рецептора Fc на эффекторной клетке и специфичность связывания антигена или эпитопа на клетке-мишени, например, опухолевой клетке.

Раскрытые в настоящей заявке антитела могут быть моноклональными антителами. Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем описании, относится к препарату антител с одномолекулярным составом. Моноклональное антитело демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность. В одном воплощении моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая содержит В-клетку, полученную от животного, отличного от человека, например мыши, слитую с иммортализованной клеткой.

Описанные в настоящей заявке антитела могут быть рекомбинантными антителами. Термин «рекомбинантное антитело», используемый в настоящем описании, включает все антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью рекомбинантных средств, такие как (a) антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулинов или полученной из него гибридоме, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Описанные в настоящей заявке антитела могут быть получены из разных видов, включая, без ограничения указанным, мышь, крысу, кролика, морскую свинку и человека.

Описанные в настоящей заявке антитела включают поликлональные и моноклональные антитела и включают антитела IgA, такие как IgA1 или IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM и IgD. В различных воплощениях антитело представляет собой антитело IgG1, более конкретно, IgG1, каппа или IgG1, изотип лямбда (например, IgG1, κ , λ), антитело IgG2a (например, IgG2a, κ , λ), антитело IgG2b (например, IgG2b, κ , λ), антитело IgG3 (например, IgG3, κ , λ) или антитело IgG4 (например, IgG4, κ , λ).

Термин «трансфектома», используемый в настоящей заявке, включает рекомбинантные эукариотические клетки-хозяева, экспрессирующие антитело, такие как клетки CHO, клетки NS/0, клетки HEK293, клетки HEK293T, растительные клетки или клетки грибов, включая дрожжевые клетки.

Используемый в настоящей заявке термин «гетерологическое антитело» определяется в отношении трансгенного организма, продуцирующего такое антитело. Этот термин относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность или кодируемую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующими тем последовательностям, которые обнаружены в организме, не являющимся частью данного трансгенного организма, и обычно полученными от видов, отличных от трансгенного организма.

Используемый в настоящей заявке термин «гетерогибридное антитело» относится к антителу, имеющему легкую и тяжелую цепи различного видового происхождения. Например, антитело, имеющее тяжелую цепь антитела человека, связанную с легкой цепью антитела мыши, представляет собой гетерогибридное антитело.

Изобретение включает все описанные в настоящей заявке антитела и производные антител, которые для целей изобретения охватываются термином «антитело». Термин «производные антитела» относится к любой модифицированной форме антитела, например, конъюгату антитела и другого агента или антитела, или фрагменту антитела.

Описанные в настоящей заявке антитела предпочтительно являются выделенными. «Выделенный» означает измененный по отношению к своему естественному состоянию или изъятый из природного окружения. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественно присутствующие в организме живого животного, не выделены, но те же самые нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сосуществующих материалов их природного окружения, являются «выделенными». Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в, по существу, очищенной форме, или в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. Термин «выделенное антитело», используемый в данной заявке, включает антитело, которое по существу является свободным от других антител, обладающих иной антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CLDN18.2, по существу свободно от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CLDN18.2). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого CLDN18.2, может, однако, обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например, из организма других видов (например, видовых гомологов CLDN18.2). Кроме того, выделенное антитело может быть, по существу, свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном воплощении изобретения комбинация «выделенных» моноклональных антител относится к антителам, имеющим различную специфичность и объединенным в хорошо определенную композицию или смесь.

Термин «связывание» по изобретению предпочтительно относится к специфическому связыванию.

Согласно настоящему изобретению, антитело способно связываться с заранее определенной мишенью, если оно обладает значительной аффинностью к указанной заранее определенной мишени и связывается с указанной заранее определенной мишенью в стандартных анализах. «Аффинность» или «аффинность связывания» часто измеряют равновесной константой диссоциации (KD). Предпочтительно термин «значительная аффинность» относится к связыванию с заранее определенной мишенью с константой диссоциации (KD) 10^{-5} М или ниже, 10^{-6} М или ниже, 10^{-7} М или ниже, 10^{-8} М или ниже, 10^{-9} М или ниже, 10^{-10} М или ниже, 10^{-11} М или ниже или 10^{-12} М или ниже.

Антитело не способно (по существу) связываться с мишенью, если оно не имеет значительной аффинности к указанной мишени и не связывается в значительной степени, в частности, не связывается детектируемым образом, с указанной мишенью в стандартных анализах. Предпочтительно антитело не связывается с указанной мишенью выявляемым образом, если присутствует в концентрации вплоть до 2, предпочтительно 10, более предпочтительно 20, в частности 50 или 100 мкг/мл или выше. Предпочтительно антитело не обладает значительной аффинностью к мишени, если оно связывается с указанной мишенью с KD , которая по меньшей мере в 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 или 10^6 раз выше, чем KD для связывания с заданной мишенью, с которой антитело способно связываться. Например, если KD для связывания антитела с мишенью, с которой антитело способно связываться, составляет 10^{-7} М, KD для связывания с мишенью, к которой антитело не имеет значительной аффинности, будет составлять по меньшей мере 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Антитело является специфичным в отношении заранее определенной мишени, если оно способно связываться с указанной заранее определенной мишенью, но не способно связываться с другими мишенями, т.е. не имеет значительной аффинности к другим мишеням и не связывается в значительной степени с другими мишенями в стандартных анализах. Согласно изобретению, антитело является специфичным в отношении CLDN18.2, если оно способно связываться с CLDN18.2, но не способно (по существу) связываться с другими мишенями. Предпочтительно антитело является специфичным в отношении CLDN18.2, если аффинность и связывание с такими другими мишенями значительно не превышает аффинность или связывание с белками, неродственными CLDN18.2, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин, сывороточный альбумин человека (HSA) или неклаудиновые трансмембранные белки, такие как молекулы МНС или рецептор трансферрина, или любой другой конкретный полипептид. Предпочтительно антитело является специфичным в отношении заданной мишени, если оно связывается с указанной мишенью с KD , которая по меньшей мере в 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 или 10^6 раз меньше, чем KD связывания с мишенью, по отношению к которой антитело не специфично. Например, если KD связывания антитела с мишенью, по отношению к которой оно специфично, составляет 10^{-7} М, KD связывания с мишенью, по отношению к которой оно неспецифично, будет составлять по меньшей мере 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Связывание антитела с мишенью можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., «Antibody-Antigen Interactions» In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N

У (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способы, описанные в данных источниках. Аффинности можно легко определить с использованием обычных методик, таких как равновесный диализ; с помощью прибора ВІАscore 2000, используя общие процедуры, указанные производителем; радиоиммуноанализ с использованием радиоактивно меченного антигена-мишени; или другая методика, известная специалисту в данной области. Данные об аффинности можно анализировать, например, способом Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-антиген может варьировать при измерении в разных условиях, например, при разных концентрациях соли, разных рН. Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания антигена, например, KD, IC50, предпочтительно проводят с использованием стандартизированных растворов антител и антигена и стандартизированного буфера.

Используемый в настоящей заявке термин «изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Используемый в настоящей заявке термин «переключение изотипа» относится к явлению, посредством которого класс или изотип антитела изменяется с одного класса Ig на один из других классов Ig.

Термин «существующий в природе», используемый в настоящей заявке применительно к объекту, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника, и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории, является существующей в природе.

Термин «реаранжированный» («перегруппированный»), используемый в настоящей заявке, относится к конфигурации локуса тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, в которой сегмент V расположен непосредственно рядом с сегментом D-J или J в конформации, кодирующей по существу полный домен VH или VL, соответственно. Реаранжированный локус гена иммуноглобулина (антитела) можно идентифицировать путем сравнения с ДНК зародышевой линии; реаранжированный локус будет иметь по меньшей мере один рекомбинированный элемент гомологии гептамер/нонамер.

Термин «нереаранжированный» или «конфигурация зародышевой линии», используемый в настоящей заявке в отношении V-сегмента, относится к конфигурации, в

которой V-сегмент не перегруппирован, чтобы быть непосредственно смежным с D- или J-сегментом.

Согласно изобретению анти-CLDN18.2 антитело представляет собой антитело, способное связываться с эпитопом, присутствующим в CLDN18.2, предпочтительно с эпитопом, расположенным во внеклеточных доменах CLDN18.2, в частности, в первом внеклеточном домене, предпочтительно в аминокислотных положениях 29–78 в CLDN18.2. В конкретных воплощениях анти-CLDN18.2 антитело представляет собой антитело, способное связываться с (i) эпитопом на CLDN18.2, который отсутствует в молекуле CLDN18.1, предпочтительно с SEQ ID NO: 3, 4 и 5, (ii) эпитопом, локализованным на петле 1 CLDN18.2, предпочтительно с SEQ ID NO: 8, (iii) эпитопом, локализованным на петле 2 CLDN18.2, предпочтительно с SEQ ID NO: 10, (iv) эпитопом, локализованным на петле D3 CLDN18. 2, предпочтительно с SEQ ID NO: 11, (v) эпитопом, который охватывает петлю 1 CLDN18.2 и петлю D3 CLDN18.2, или (vi) негликозилированным эпитопом, локализованным на петле D3 CLDN18.2, предпочтительно с SEQ ID NO: 9.

Согласно изобретению анти-CLDN18.2 антитело предпочтительно представляет собой антитело, связывающееся с CLDN18.2, но не с CLDN18.1. Предпочтительно анти-CLDN18.2 антитело является специфичным в отношении CLDN18.2. Предпочтительно анти-CLDN18.2 антитело представляет собой антитело, связывающееся с CLDN18.2, экспрессируемым на клеточной поверхности. В особенно предпочтительных воплощениях анти-CLDN18.2 антитело связывается с нативными эпитопами CLDN18.2, присутствующими на поверхности живых клеток. Предпочтительно анти-CLDN18.2 антитело связывается с одним или несколькими пептидами, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 и 48-50. Предпочтительно анти-CLDN18.2 антитело является специфичным в отношении вышеупомянутых белков, пептидов или иммуногенных фрагментов или их производных. Анти-CLDN18.2 антитело может быть получено способом, включающим стадию иммунизации животного белком или пептидом, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46, и 48-50, или нуклеиновой кислотой, или клеткой-хозяином, экспрессирующей указанный белок или пептид. Предпочтительно антитело связывается с клетками рака, в частности с клетками указанных выше типов рака, и, предпочтительно, по существу, не связывается с нераковыми клетками.

Предпочтительно связывание анти-CLDN18.2 антитела с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, индуцирует или опосредует гибель клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Клетки, экспрессирующие CLDN18.2, предпочтительно

представляют собой раковые клетки и, в частности, они выбраны из группы, состоящей из опухолевых клеток рака желудка, пищевода, поджелудочной железы, легкого, яичника, ободочной кишки, печени, головы и шеи и желчного пузыря. Предпочтительно антитело индуцирует или опосредует гибель клеток, индуцируя одно или несколько событий из числа лизиса, опосредованного комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ), лизиса, опосредованного антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), апоптоза и ингибирования пролиферации клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Предпочтительно АЗКЦ-опосредованный лизис клеток происходит в присутствии эффекторных клеток, которые в конкретных воплощениях выбраны из группы, состоящей из моноцитов, мононуклеарных клеток, НК-клеток и PMN. Ингибирование пролиферации клеток можно измерить *in vitro* путем определения пролиферации клеток в анализе с использованием бромдезоксипуридина (5-бром-2-дезоксипуридина, BrdU). BrdU представляет собой синтетический нуклеозид, который является аналогом тимидина и может быть включен во вновь синтезированную ДНК реплицирующихся клеток (в S-фазе клеточного цикла), заменяя тимидин во время репликации ДНК. Обнаружение указанного включенного химического вещества с использованием, например, антител, специфичных для BrdU, указывает на клетки, которые активно реплицировали свою ДНК.

В предпочтительных воплощениях антитела, описанные в настоящей заявке, могут характеризоваться одним или несколькими из следующих свойств:

- a) специфичность к CLDN18.2;
- b) аффинность связывания с CLDN18.2 около 100 нМ или менее, предпочтительно около 5^{-10} нМ или менее и, более предпочтительно, около 1-3 нМ или менее,
- c) способность индуцировать или опосредовать КЗЦ в отношении CLDN18.2-положительных клеток;
- d) способность индуцировать или опосредовать АЗКЦ в отношении CLDN18.2-положительных клеток;
- e) способность подавлять рост CLDN18.2-положительных клеток;
- f) способность индуцировать апоптоз CLDN18.2-положительных клеток.

В особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело производится гибридами, депонированными в DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Брауншвейг, Германия; новый адрес: Inhoffenstr. 7B, 31824 Брауншвейг, Германия) и имеющими следующие обозначения и номера доступа:

- a. 182-D1106-055, номер доступа DSM ACC2737, депонирована 19 октября 2005 г.
- b. 182-D1106-056, номер доступа DSM ACC2738, депонирована 19 октября 2005 г.
- c. 182-D1106-057, номер доступа DSM ACC2739, депонирована 19 октября 2005 г.

- d. 182-D1106-058, номер доступа DSM ACC2740, депонирована 19 октября 2005 г.
 e. 182-D1106-059, номер доступа DSM ACC2741, депонирована 19 октября 2005 г.
 f. 182-D1106-062, номер доступа DSM ACC2742, депонирована 19 октября 2005 г.,
 g. 182-D1106-067, номер доступа DSM ACC2743, депонирована 19 октября 2005 г.
 h. 182-D758-035, номер доступа DSM ACC2745, депонирована 17 ноября 2005 г.
 i. 182-D758-036, номер доступа DSM ACC2746, депонирована 17 ноября 2005 г.
 j. 182-D758-040, номер доступа DSM ACC2747, депонирована 17 ноября 2005 г.
 k. 182-D1106-061, номер доступа DSM ACC2748, депонирована 17 ноября 2005 г.
 l. 182-D1106-279, номер доступа DSM ACC2808, депонирована 26 октября 2006 г.
 m. 182-D1106-294, номер доступа DSM ACC2809, депонирована 26 октября 2006 г.
 n. 182-D1106-362, номер доступа DSM ACC2810, депонирована 26 октября 2006 г.

Предпочтительными антителами по изобретению являются те, которые продуцируются и могут быть получены из вышеописанных гибридом; 37G11 в случае 182-D1106-055, 37H8 в случае 182-D1106-056, 38Г5 в случае 182-D1106-057, 38H3 в случае 182-D1106-058, 39F11 в случае 182-D1106-059, 43A11 в случае 182-D1106-062, 61C2 в случае 182-D1106-067, 26B5 в случае 182-D758-035, 26D12 в случае 182-D758-036, 28D10 в случае 182-D758-040, 42E12 в случае 182-D1106-061, 125E1 в случае 182-D1106-279, 163E12 в случае 182-D1106-294 и 175D10 в случае 182-D1106-362; и их химеризированные и гуманизированные формы.

Предпочтительные химеризированные антитела и их последовательности показаны в следующей таблице.

	клон	МАТ	Изотип	вариабельная область	химеризированное антитело
тяжелая цепь	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 14
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 15
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 16
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 18
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 17
легкая цепь	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 19
	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 21
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 20
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 22

	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 25
	175Д10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 24
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 23
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 26
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 27
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 28

В предпочтительных воплощениях антитела, в частности химеризованные формы антител по изобретению, включают антитела, содержащие константную область тяжелой цепи (CH), содержащую аминокислотную последовательность, полученную из константной области тяжелой цепи человека, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 13 или 52, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант. В дополнительных предпочтительных воплощениях антитела, в частности химеризованные формы антител по изобретению, включают антитела, содержащие константную область легкой цепи (CL), содержащую аминокислотную последовательность, полученную из константной области легкой цепи человека, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 12, или его функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант. В конкретном предпочтительном воплощении антитела, в частности химеризованные формы антител по изобретению, включают антитела, которые содержат CH, включающую аминокислотную последовательность, полученную из CH человека, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 13 или 52, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант, и содержат CL, содержащую аминокислотную последовательность, полученную из CL человека, такую как аминокислотная последовательность, представленная SEQ ID NO: 12, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

В одном воплощении анти-CLDN18.2 антитело представляет собой химерное моноклональное антитело IgG1 мыши/человека, содержащее переменную область легкой каппа-цепи мыши, константную область легкой каппа-цепи человека аллотипа Km(3), переменную область тяжелой цепи мыши, константную область IgG1 человека, аллотипа G1m(3).

В некоторых предпочтительных воплощениях химеризированные формы антител включают антитела, включающие тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 51, или их функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант и/или включающий легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, или их функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

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

(i) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 14, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 21, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант,

(ii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 15, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 20, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант,

(iii) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 16, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 22, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант,

(iv) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 18, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 25, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант,

функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

В одном особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 17, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 24, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

В одном особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 51, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 24, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

Фрагмент аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 51, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 и 28, предпочтительно относится к указанной последовательности, из которой удалены 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 аминокислоты на N-конце.

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, или их функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, или их функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант.

В некоторых предпочтительных воплощениях анти-CLDN18.2 антитело включает комбинацию переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), выбранных из следующих вариантов (i)-(ix):

(i) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 29, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной

последовательности или его функциональный вариант, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 42, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант,

(ix) VH содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 34, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности, или его функциональный вариант, и VL содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 43, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

В одном особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 32, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант. В более предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 32, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39, такое как IMAV362 (золбетуксимаб).

Термин «фрагмент» относится, в частности, к одному или нескольким участкам, определяющим комплементарность (CDR), предпочтительно, по меньшей мере, к последовательности CDR3, необязательно в комбинации с последовательностью CDR1 и/или последовательностью CDR2, переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL). В одном воплощении указанный один или несколько участков, определяющих комплементарность (CDR), выбраны из набора участков, определяющих комплементарность CDR1, CDR2 и CDR3. В особенно предпочтительном воплощении термин «фрагмент» относится к определяющим комплементарность участкам CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL).

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VH, содержащую набор участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих воплощений (i)-(vi):

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

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

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

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

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

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

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VH, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно две, более предпочтительно все три последовательности CDR набора участков, определяющих комплементарность CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из приведенных выше воплощений (i) - (vi).

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VL, содержащую набор участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих воплощений (i)-(ix):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VL, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно две, более предпочтительно все три последовательности CDR набора участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из приведенных выше воплощений (i) - (ix).

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает комбинацию VH и VL, каждая из которых содержит набор определяющих комплементарность участков, CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих воплощений (i)-(ix):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает VH, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно две, более предпочтительно все три последовательности CDR VH набора участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из указанных выше воплощений. (i)-(ix), и VL, содержащую по меньшей мере одну, предпочтительно две, более предпочтительно все три последовательности CDR VL набора участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3 из тех же воплощений (i)-(ix)).

Термин «по меньшей мере одна, предпочтительно две, более предпочтительно все три последовательности CDR» предпочтительно относится по меньшей мере к последовательности CDR3, необязательно в сочетании с последовательностью CDR1 и/или последовательностью CDR2.

В одном особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело включает комбинацию VH и VL, каждая из которых содержит набор участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, как указано ниже:

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

В дополнительных предпочтительных воплощениях анти-CLDN18.2 антитело предпочтительно содержит один или более участков, определяющих комплементарность (CDR), предпочтительно, по меньшей мере, участок CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) и/или варибельной области легкой цепи (VL) моноклонального анти-CLDN18.2 антитела, предпочтительно моноклонального анти-CLDN18.2 антитела, описанного в настоящей заявке, и предпочтительно содержит один или более участков, определяющих комплементарность (CDR), предпочтительно по меньшей мере, участок CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH) и/или варибельной области легкой цепи (VL), как раскрыто в настоящей заявке. В одном воплощении указанный один или более

участков, определяющих комплементарность (CDR), выбраны из набора участков, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, описанных в настоящей заявке. В особенно предпочтительном воплощении анти-CLDN18.2 антитело предпочтительно содержит участки, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL) моноклонального анти-CLDN18.2 антитела, предпочтительно моноклонального анти-CLDN18.2 антитела, описанного в настоящей заявке, и предпочтительно содержит участки, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL), описанных в настоящей заявке.

В одном воплощении антитело, содержащее один или более CDR, набор CDR или комбинацию наборов CDR, как описано в настоящей заявке, содержит указанные CDR вместе с промежуточными каркасными участками. Предпочтительно CDR также будет включать по меньшей мере около 50% одного или обоих из первого и четвертого каркасных участков, причем 50% составляют С-концевые области первого каркасного участка и 50% составляют N-концевые области четвертого каркасного участка. Конструирование антител, полученных методами рекомбинантной ДНК, может обеспечить введение остатков на N- или С-конце переменных областей, кодируемых линкерами, что делается для облегчения клонирования или других стадий манипуляции, включая введение линкеров для соединения переменных областей или соединения переменных областей с дополнительными белковыми последовательностями, включая последовательности, раскрытые в настоящей заявке.

В одном воплощении антитело, содержащее один или несколько CDR, набор CDR или комбинацию наборов CDR, как описано в настоящей заявке, содержит указанные CDR в каркасном участке человеческого антитела.

В настоящем описании ссылка на антитело, содержащее по отношению к его тяжелой цепи конкретную цепь или конкретную область или последовательность, предпочтительно относится к ситуации, когда все тяжелые цепи указанного антитела содержат указанную конкретную цепь, область или последовательность. Это относится соответственно и к легкой цепи антитела.

Возможно, что раскрытые в настоящей заявке анти-CLDN18.2 антитела (например, экспрессированные разными клеточными линиями) имеют разные форматы гликозилирования. Однако все анти-CLDN18.2 антитела считаются раскрытыми в настоящей заявке, независимо от характера их гликозилирования, модификации или делеции. Таким образом, для целей настоящего изобретения анти-CLDN18.2 антитела

могут быть гликозилированными или негликозилированными. Когда анти-CLDN18.2 антитела гликозилированы, они могут иметь любой возможный характер гликозилирования. Кроме того, каждая тяжелая цепь в антителе может иметь одинаковый характер гликозилирования или две тяжелые цепи могут иметь разные форматы гликозилирования. Также в настоящей заявке описан сайт-направленный мутагенез CH2-домена антитела для устранения гликозилирования, чтобы избежать изменений в иммуногенности, фармакокинетике и/или эффекторных функциях, возникающих в результате гликозилирования, отличного от гликозилирования в клетках человека.

Используемый в настоящем описании термин «гликозилирование» относится к структуре углеводных единиц, которые ковалентно связаны с антителом. Когда говорится, что анти-CLDN18.2 антитела, раскрытые в настоящей заявке, имеют конкретный характер гликозилирования, подразумевается, что большинство упомянутых анти-CLDN18.2 антител имеют этот конкретный характер гликозилирования. В других аспектах, когда говорится, что анти-CLDN18.2 антитела, раскрытые в настоящей заявке, имеют конкретный характер гликозилирования, подразумевается, что количество, превышающее или равное 50, 75, 90, 95, 99 или 100% антител, имеют этот особый характер гликозилирования.

Гликозилирование полипептидов обычно является N-связанным или O-связанным. Гликозилирование полипептидов антител обычно является N-связанным и образует биантеннарную структуру. N-связанное гликозилирование относится к соединению углеводного фрагмента с боковой цепью остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, в которых X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативной связи углеводного фрагмента с боковой цепью аспарагина. Следовательно, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в антителе создает потенциальный сайт гликозилирования.

Три различные биантеннарные структуры гликана, обозначенные как «G0», «G1» и «G2», имеют 0, 1 или 2 концевых галактозных остатка на невозстанавливаемом конце гликана, соответственно. В некоторых случаях структура гликана может также иметь остаток фукозы, связанный с N-ацетилглюкозамином, который ковалентно связан с аминокислотой аспарагином в антителе. Когда присутствует фукоза (F), номенклатура биантеннарных гликанов изменяется на «G0F», «G1F» или «G2F» в зависимости от количества концевых остатков галактозы. Кроме того, когда антитело включает обе тяжелые цепи, номенклатура гликанов повторяется для каждой из двух тяжелых цепей. Гликоформа «G0F, G0F» представляет собой структуру, в которой обе тяжелые цепи

имеют связанный гликан G0, и каждый гликан G0 имеет остаток фукозы (F), связанный с N-ацетилглюкозамином. Гликоформа «G0F, G1F» представляет собой структуру, в которой одна из тяжелых цепей имеет связанный гликан G0, а другая тяжелая цепь имеет связанный гликан G1, причем каждый гликан G0 и гликан G1 имеет остаток фукозы (F), связанный с N -ацетилглюкозамин.

В различных воплощениях анти-CLDN18.2 антитела, описанные в настоящей заявке, имеют тип гликозилирования, который представляет собой преимущественно G0F или G1F, в частности G0F. Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь характер гликозилирования, который представляет собой G0F более чем на 50%, более чем на 60%, более чем на 70% или даже выше. Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь характер гликозилирования, который соответствует G0F от 65% до 80%. Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь характер гликозилирования, который соответствует G1F от 10 до 20%.

В различных воплощениях анти-CLDN18.2 антитела, описанные в настоящей заявке, имеют характер гликозилирования, который может быть выбран из группы, состоящей из «G0F, G0F», «G0F, G1F» и «G1F, G1F» и их комбинаций. Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь характер гликозилирования «G0F, G0F» в случае более чем 50% продуцируемых антител. Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь характер гликозилирования «G0F, G1F» менее чем в случае 50% продуцируемых антител. Например, анти-CLDN18.2 антитела, описанные в настоящей заявке, могут иметь характер гликозилирования, который представляет собой «G0F, G0F» или «G0F, G1F». Анти-CLDN18.2 антитела могут иметь комбинацию различных типов гликозилирования. Например, анти-CLDN18.2 антитела могут представлять собой смесь антител, в которой некоторые антитела имеют характер гликозилирования «G0F, G0F», а другие имеют характер гликозилирования «G0F, G1F», например, в соотношении около 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 или даже выше.

В одном воплощении анти-CLDN18.2 антитело конкурирует за связывание CLDN18.2 с анти-CLDN18.2 антителом, описанным в настоящей заявке, и/или обладает специфичностью к CLDN18.2 анти-CLDN18.2 антитела, описанного в настоящей заявке. В этих и других воплощениях анти-CLDN18.2 антитело может быть высоко гомологичным анти-CLDN18.2 антителу, описанному в настоящей заявке. Предполагается, что предпочтительное анти-CLDN18.2 антитело имеет участки CDR, идентичные или высоко гомологичные участкам CDR описанного в настоящей заявке анти-CLDN18.2 антитела. Под «высокой гомологичностью» подразумевается, что в каждом участке CDR может быть сделано от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, например, от 1 до 3, или 1, или 2 замен.

Термин «конкурировать» относится к конкуренции между двумя связывающими молекулами, например, антителами, за связывание с антигеном-мишенью. Если две связывающие молекулы не блокируют друг друга при связывании с целевым антигеном, такие связывающие молекулы не конкурируют, и это указывает на то, что указанные связывающие молекулы не связываются с одной и той же областью, то есть эпитопом, целевого антигена. Специалисту в данной области техники хорошо известно, как тестировать конкуренцию связывающих молекул, таких как антитела, за связывание с антигеном-мишенью. Примером такого способа является так называемый перекрестно-конкурентный анализ, который можно, например, проводить в формате ELISA или проточной цитометрии. Например, при анализе на основе ELISA лунки планшета для ELISA покрывают одним из антител, затем добавляют конкурирующее антитело и His-меченный антиген/мишень и определяют, ингибирует ли добавленное антитело связывание His-меченого антигена с антителом, которым покрыты лунки, например, путем внесения биотинилированного анти-His-антитела с последующим добавлением стрептавидина-поли-HRP и с развитием реакции с ABTS и дальнейшим измерением оптической плотности при 405 нм. В то же время, анализ проточной цитометрии можно проводить путем инкубации клеток, экспрессирующих антиген/мишень, с избытком немеченого антитела, инкубации клеток с субоптимальной концентрацией меченого биотином антитела с последующей инкубацией с флуоресцентно меченым стрептавидином и анализом проточной цитометрией.

Две связывающие молекулы обладают «одинаковой специфичностью», если они связываются с одним и тем же антигеном или с одним и тем же эпитопом. Распознает ли тестируемая молекула тот же эпитоп, что и известная связывающая молекула, т.е. связываются ли связывающие молекулы с одним и тем же эпитопом, можно проверить различными способами, известными специалисту в данной области. Конкуренция связывающих молекул, таких как антитела, за один и тот же эпитоп может указывать на то, что связывающие молекулы связываются с одним и тем же эпитопом. Конкуренцию между связывающими молекулами можно обнаружить с помощью анализа перекрестного блокирования. Например, конкурентный анализ ELISA можно использовать в качестве анализа перекрестного блокирования. Например, целевой антиген может быть нанесен на лунки планшета для микротитрования и далее могут быть добавлены антигенсвязывающие антитела и конкурирующие тестируемые антитела-кандидаты. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с антигеном в лунке, косвенно коррелирует со связывающей способностью конкурирующего тестируемого антитела-кандидата, которое конкурирует с ним за связывание с тем же эпитопом. В частности, чем

больше аффинность конкурирующего тестируемого антитела-кандидата к тому же эпитопу, тем меньше количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, покрытой антигеном. Количество антигенсвязывающего антитела, связанного с лункой, можно измерить путем мечения антител детектируемыми или измеряемыми метящими веществами.

Термин «гомологичный» относится к сходству последовательностей или идентичности последовательностей двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Если какое-либо положение в обеих сравниваемых последовательностях занято одной и той же субъединицей мономера основания или аминокислоты, то молекулы гомологичны в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, разделенных на количество сравниваемых положений $X 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то эти две последовательности гомологичны на 60%. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для получения максимальной гомологии. Гомологичные последовательности, согласно настоящей заявке, имеют по меньшей мере 40%, в частности, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотных или нуклеотидных остатков.

Термин «фрагмент» по отношению к аминокислотной последовательности (пептид или белок) относится к части аминокислотной последовательности, т.е. последовательности, которая представляет собой аминокислотную последовательность, укороченную на N-конце и/или C-конце. Фрагмент, укороченный на C-конце (N-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 3'-конец открытой рамки считывания. Фрагмент, укороченный на N-конце (C-концевой фрагмент), может быть получен, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 5'-конец открытой рамки считывания, при условии, что укороченная открытая рамка считывания содержит стартовый кодон, служащий для инициации трансляции. Фрагмент аминокислотной последовательности включает, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% аминокислотных остатков исходной аминокислотной последовательности. Фрагмент аминокислотной последовательности предпочтительно

содержит по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 последовательных аминокислот исходной аминокислотной последовательности.

«Фрагмент» последовательности антитела, когда он заменяет указанную последовательность антитела, предпочтительно сохраняет связывающую способность указанного антитела с CLDN18.2 и предпочтительно выполняет функции указанного антитела, как описано в настоящей заявке, например, осуществляет лизис, опосредованный КЗЦ, или лизис, опосредованный АЗКЦ.

Под «вариантом» или «вариантным белком» или «вариантным полипептидом» в данной заявке подразумевается белок, который отличается от исходного белка по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. Исходный полипептид может быть природным полипептидом или полипептидом дикого типа (WT) или может быть модифицированной версией полипептида дикого типа. Предпочтительно вариантный полипептид имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным полипептидом, например, от 1 до около 20 аминокислотных модификаций и предпочтительно от 1 до около 10 или от 1 до около 5 аминокислотных модификаций по сравнению с исходным полипептидом.

Под «исходным полипептидом», «родительским белком», «полипептидом-предшественником» или «белком-предшественником» в контексте настоящего описания подразумевается немодифицированный полипептид, который впоследствии модифицируется для создания варианта. Исходный полипептид может быть полипептидом дикого типа или вариантом или сконструированной версией полипептида дикого типа.

Под последовательностью «дикого типа», «WT» или «нативной» последовательностью в данной заявке подразумевается аминокислотная последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные варианты. Белок или полипептид дикого типа имеет аминокислотную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

Для целей настоящего изобретения «варианты» аминокислотной последовательности (пептид, белок или полипептид) включают варианты со вставкой аминокислот, варианты с добавлением аминокислот, варианты с делецией аминокислот и/или варианты с заменой аминокислот. Термин «вариант» включает все мутанты, варианты сплайсинга, варианты, модифицированные после трансляции, конформации,

изоформы, аллельные варианты, видовые варианты и видовые гомологи, в частности те, которые встречаются в природе.

Аминокислотные варианты со вставкой включают вставки одной или двух или более аминокислот в конкретную аминокислотную последовательность. В случае вариантов аминокислотной последовательности, имеющих вставку, один или несколько аминокислотных остатков вставляются в конкретный сайт аминокислотной последовательности, хотя также возможна случайная вставка с соответствующим скринингом полученного продукта. Варианты присоединения аминокислот включают слияния на амино- и/или карбокси-конце одной или нескольких аминокислот, например, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или большего количества аминокислот. Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или нескольких аминокислот из последовательности, например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или большего количества аминокислот. Делеции могут находиться в любом положении белка. Варианты с делецией аминокислот, которые содержат делецию на N-конце и/или C-конце белка, также называются вариантами с укорочением на N-конце и/или C-конце. Аминокислотные варианты с заменой характеризуются тем, что, по меньшей мере, один остаток в последовательности удаляется, а другой остаток вставляется на его место. Предпочтение отдается модификациям в положениях аминокислотной последовательности, которые не являются консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или замене аминокислот другими, имеющими аналогичные свойства. Предпочтительно, аминокислотные замены в пептидных и белковых вариантах представляют собой консервативные аминокислотные замены, то есть замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативная замена аминокислот включает замену одной из семейства аминокислот, которые имеют сходные боковые цепи. Природные аминокислоты обычно делятся на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты. В одном воплощении консервативные аминокислотные замены включают замены в следующих группах:

глицин, аланин;

валин, изолейцин, лейцин;

аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота;

аспарагин, глутамин;

серин, треонин;
лизин, аргинин; и
фенилаланин, тирозин.

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая является вариантом указанной данной (референсной) аминокислотной последовательности, будет составлять по меньшей мере около 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%. Степень сходства или идентичности дается предпочтительно для аминокислотной области, которая составляет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере, около 80%, по меньшей мере, около 90% или около 100% всей длины референсной аминокислотной последовательности. Например, если референсная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, степень сходства или идентичности дается предпочтительно по меньшей мере для около 20, по меньшей мере для около 40, по меньшей мере для около 60, по меньшей мере для около 80, по меньшей мере для около 100, по меньшей мере для около 120, по меньшей мере для около 140, по меньшей мере для около 160, по меньшей мере для около 180 или для около 200 аминокислот, предпочтительно непрерывных аминокислот. В предпочтительных воплощениях степень сходства или идентичности дана для всей длины референсной аминокислотной последовательности. Выравнивание для определения сходства последовательностей, предпочтительно идентичности последовательностей, может быть выполнено с помощью известных в данной области инструментов, предпочтительно с использованием наилучшего выравнивания последовательностей, например, с помощью Align, с помощью стандартных настроек, предпочтительно EMBOS::Needle, Matrix: Blosum62, штраф за открытие разрыва 10,0, штраф за продолжение разрыва 0,5.

«Сходство последовательностей» определяет процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены. «Идентичность последовательностей» для двух аминокислотных последовательностей определяет процент аминокислот, которые идентичны между собой в данных последовательностях.

Термин «процентная идентичность» предназначен для обозначения процента аминокислотных остатков, которые идентичны между собой в двух сравниваемых последовательностях, полученного после наилучшего выравнивания, причем этот процент

является чисто статистическим, а различия между двумя последовательностями распределены случайным образом и более по всей их длине. Сравнение последовательностей двух аминокислотных последовательностей обычно проводят путем сравнения этих последовательностей после их оптимального выравнивания, при этом упомянутое сравнение проводят по сегментам или «окну сравнения» для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может производиться, помимо ручного выравнивания, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма локальной гомологии Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью способа поиска сходства Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444, или с помощью компьютерных программ, использующих эти алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин).

Процент идентичности рассчитывается путем определения количества идентичных положений между двумя сравниваемыми последовательностями, деления этого числа на количество сравниваемых положений и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процентную идентичность между этими двумя последовательностями.

Сведения, приведенные в настоящей заявке в отношении конкретных аминокислотных последовательностей, например, перечисленных в списке последовательностей, должны быть истолкованы как относящиеся также к вариантам указанных конкретных последовательностей, которые представляют собой последовательности, функционально эквивалентные перечисленным конкретным последовательностям, например, аминокислотные последовательности, обладающие свойствами, идентичными или подобными свойствам конкретных аминокислотных последовательностей. Одним из важных свойств является сохранение связывания антитела с его мишенью или сохранение эффекторных функций антитела. Предпочтительно последовательность, которая является вариантом конкретной последовательности, когда она заменяет конкретную последовательность в молекуле антитела, сохраняет связывание указанного антитела с CLDN18.2 и предпочтительно выполняет функции указанного антитела, как описано в настоящей заявке, например, КЗЦ-опосредованный лизис или АЗКЦ-опосредованный лизис.

Специалистам в данной области будет понятно, что, в частности, последовательности CDR, гипервариабельных и вариабельных участков можно модифицировать без утраты способности связывать CLDN18.2. Например, участки CDR

будут либо идентичны, либо высоко гомологичны участкам антител, указанным в настоящем описании. Под «высоко гомологичным» подразумевается, что в CDR может быть сделано от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, например, от 1 до 3, или 1, или 2 замены. Кроме того, гипервариабельные и вариабельные участки могут быть модифицированы таким образом, чтобы они демонстрировали существенную гомологию с участками антител, специальным образом раскрытых в настоящей заявке.

Термин «функциональный вариант», используемый в данном описании, относится к вариантной молекуле или последовательности, которая содержит аминокислотную последовательность, измененную одной или несколькими аминокислотами по сравнению с аминокислотной последовательностью исходной молекулы или последовательности, и которая все еще способна выполнять одну или более функций исходной молекулы или последовательности, например, связываться с молекулой-мишенью или содействовать связыванию с молекулой-мишенью. Если исходная молекула или последовательность представляет собой молекулу или последовательность антитела, изменение предпочтительно происходит не в вариабельных областях антитела, более предпочтительно не в CDR-участках антитела. В одном воплощении функциональный вариант либо сам по себе, либо в сочетании с другими элементами конкурирует за связывание с молекулой-мишенью с исходной молекулой или последовательностью. Другими словами, модификации аминокислотной последовательности исходной молекулы или последовательности не оказывают существенного влияния на характеристики связывания молекулы или последовательности и не изменяют их. В различных воплощениях связывание функционального варианта может быть снижено, но все еще оставаться значительным, например, связывание функционального варианта может составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% от связывания исходной молекулы или последовательности. Однако в других воплощениях связывание функционального варианта может быть усилено по сравнению с исходной молекулой или последовательностью.

Аминокислотная последовательность (пептида, белка или полипептида), «происходящая из» обозначенной аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида), относится к происхождению первой аминокислотной последовательности. Предпочтительно аминокислотная последовательность, происходящая из конкретной аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, по существу идентична или гомологична этой конкретной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотные

последовательности, полученные из конкретной аминокислотной последовательности, могут быть вариантами этой конкретной последовательности или ее фрагмента.

Предполагается, что термин «нуклеиновая кислота», используемый в данном описании, означает ДНК и РНК. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной, предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

Согласно изобретению, термин «экспрессия» используется в его самом общем значении и включает продуцирование РНК или РНК и белка/пептида. Также термин охватывает частичную экспрессию нуклеиновых кислот. Кроме того, экспрессия может осуществляться транзиторно или стабильно.

Термин «трансгенное животное» относится к животному, имеющему геном, содержащий один или несколько трансгенов, предпочтительно трансгенов тяжелой и/или легкой цепи, или содержащему трансхромосомы (либо интегрированные, либо неинтегрированные в природную геномную ДНК животного), и которое предпочтительно способно экспрессировать трансгены. Например, трансгенная мышь может содержать трансген легкой цепи антитела человека и либо трансген тяжелой цепи антитела человека, либо трансхромосому тяжелой цепи антитела человека, так что мышь продуцирует человеческие анти-CLDN18.2 антитела при иммунизации антигеном CLDN18.2 и/или клетками, экспрессирующими CLDN18.2. Трансген тяжелой цепи антитела человека можно интегрировать в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных мышей, например, мышей HuMAb, таких как мыши HCo7 или HCo12, или трансген тяжелой цепи антитела человека можно поддерживать вне хромосомы, как в случае трансхромосомных (например, KM) мышей, описанных в WO 02/43478. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши могут быть способны продуцировать несколько изоформ человеческих моноклональных антител к CLDN18.2 (например, IgG, IgA и/или IgE) путем рекомбинации V-D-J и переключения изоформы.

Понятия «уменьшать» («редуцировать»), «снижать» или «ингибировать», при использовании в данном описании означают общее снижение или способность вызывать общее снижение, предпочтительно на 5% или более, 10% или более, 20% или более, более предпочтительно на 50% или более, а наиболее предпочтительно на 75% или более, от определенного уровня, например, от уровня экспрессии или от уровня пролиферации клеток.

Термин «ингибирование роста опухоли» в отношении конкретного лечения означает уменьшение размера опухоли, вызванное лечением, например, по сравнению с опухолью, которая не подвергалась лечению, или по сравнению с контрольным лечением. Этот термин включает уменьшение, т.е. замедление роста опухоли, уменьшение размера

опухоли по сравнению с размером опухоли в начале лечения, т.е. регрессию опухоли, и полное исчезновение опухоли, т.е. полную ремиссию. В одном воплощении регрессия опухоли, например, выраженная скоростью регрессии опухоли, вызванная лечением, раскрытым в настоящей заявке, составляет 5% или более, 10% или более, 15% или более, 20% или более, 25% или более, 30% или более или еще более.

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

Понятие «индукция» при использовании в отношении определенной активности или функции, такой как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), может означать, что до индукции такой активности или функции не было, но это также может означать, что имел место определенный уровень такой активности или функции, присутствующей до индукции, и после индукции указанная активность или функция усиливаются. Таким образом, термин «индуцирующий» также включает «усиление».

Механизмы действия МАТ

Хотя нижеследующая информация позволяет понять механизм, лежащий в основе терапевтической эффективности антител по изобретению, ее никоим образом не следует рассматривать как ограничивающую изобретение.

Раскрытые в настоящей заявке антитела предпочтительно взаимодействуют с компонентами иммунной системы, предпочтительно посредством АЗКЦ или КЗЦ. Антитела, описанные в настоящей заявке, также можно использовать для нацеливания полезных нагрузок (например, радиоизотопов, лекарственных средств или токсинов) с целью непосредственного уничтожения опухолевых клеток или их можно использовать наряду с традиционными химиотерапевтическими агентами для атаки опухоли с помощью дополнительных механизмов действия, которыми могут быть противоопухолевые иммунные ответы, которые могут были замаскированы из-за цитотоксического побочного действия химиотерапевтических средств на Т-лимфоциты. Однако антитела, описанные в настоящей заявке, также могут оказывать свое действие, просто связываясь с CLDN18.2 на клеточной поверхности, таким образом, например, блокируя пролиферацию клеток.

Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

АЗКЦ представляет собой способность эффекторных клеток уничтожать нежелательные клетки, как раскрыто в настоящей заявке, в частности указанную способность лимфоцитов, что предпочтительно требует, чтобы клетка-мишень была помечена антителом.

АЗКЦ предпочтительно возникает, когда антитела связываются с антигенами на опухолевых клетках, а Fc-домены антител взаимодействуют с Fc-рецепторами (FcR) на поверхности иммунных эффекторных клеток. Было идентифицировано несколько семейств рецепторов Fc, и специфические клеточные популяции характерным образом экспрессируют определенные рецепторы Fc. АЗКЦ можно рассматривать как механизм, непосредственно вызывающий немедленную деструкцию опухоли в различной степени, что приводит к презентации антигена и индукции ответа NK-клеток или T-клеток, направленных на опухоль. Предпочтительно индукция АЗКЦ *in vivo* будет приводить к ответу T-клеток, направленному против опухоли, и ответу антител хозяина.

Комплемент-зависимая цитотоксичность

КЗЦ — это еще один способ уничтожения клеток, которым могут управлять антитела. IgM является наиболее эффективным изотипом для активации комплемента. IgG1 и IgG3 также очень эффективны в управлении КЗЦ посредством классического пути активации комплемента. Предпочтительно в этом каскаде образование комплексов антиген-антитело приводит к раскрытию множества сайтов связывания C1q в непосредственной близости от доменов CH2 молекул антител, таких как молекулы IgG (C1q является одним из трех субкомпонентов комплемента C1). Предпочтительно эти незамаскированные сайты связывания C1q преобразуют ранее низкоаффинное взаимодействие C1q-IgG во взаимодействие с высокой авидностью, что запускает каскад событий с участием ряда других белков комплемента и приводит к протеолитическому высвобождению хемотаксических/активирующих агентов эффекторной клетки C3a и C5a. Каскад комплемента предпочтительно заканчивается образованием мембраноатакующего комплекса, который создает поры в клеточной мембране, облегчающие свободный проход воды и растворенных веществ в клетку и из нее.

Антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть получены различными методами, включая обычную технологию моноклональных антител, например, стандартный метод гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе могут быть использованы другие методы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела, является мышьяная система. Получение гибридом у мышья является очень хорошо отработанным процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры слияния (например, мышьяные миеломные клетки) и процедуры слияния также известны.

Другими предпочтительными системами животных для получения гибридом, секретирующих моноклональные антитела, являются системы крыс и кроликов (например, описанные в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), см. также Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

В еще одном предпочтительном воплощении человеческие моноклональные антитела могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышья, несущих части иммунной системы человека, а не мышьяной системы. Такие трансгенные и трансхромосомные мышья включают мышья, называемых в данном описании мышьями NuMAb и мышьями KM, соответственно, и вместе обозначаются в данном описании как «трансгенные мышья». Получение человеческих антител в организме трансгенных мышья можно осуществить, как подробно описано для CD20 в WO2004/035607.

Еще одна стратегия получения моноклональных антител заключается в прямом выделении генов, кодирующих антитела, из лимфоцитов, продуцирующих антитела определенной специфичности, например, см. Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Для получения подробной информации о разработке рекомбинантных антител см. также Welschof and Kraus, Recombinant Antibodies for Cancer Therapy ISBN-0-89603-918-8 и Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Для получения антител мышья можно иммунизировать пептидами, конъюгированными с носителем, полученными из последовательности антигена, то есть последовательности, против которой должны быть направлены антитела, в том числе обогащенного препарата рекомбинантно экспрессированного антигена или его фрагментов и/или клеток, экспрессирующих антиген, как раскрыто в настоящем описании. Альтернативно мышья можно иммунизировать ДНК, кодирующей антиген или ее фрагменты. В случае, если иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена не приводит к образованию антител, мышья также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими антиген, например, клеточной линией, для стимулирования иммунных ответов.

Иммунный ответ можно контролировать в ходе протокола иммунизации с образцами плазмы и сыворотки, полученными из хвостовой вены или в результате ретроорбитального кровотечения. Мышей с достаточными титрами иммуноглобулина можно использовать для слияния клеток. Мышей можно стимулировать внутрибрюшинно или внутривенно антигенэкспрессирующими клетками за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки для увеличения количества гибридом, секретирующих специфические антитела.

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, спленоциты и клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей можно выделить и объединить с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия мышинной миеломы. Затем полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу на продуцирование антиген-специфических антител. Отдельные лунки затем можно подвергнуть скринингу с помощью ELISA на наличие гибридом, секретирующих антитела. С помощью иммунофлуоресцентного анализа и анализа FACS с использованием клеток, экспрессирующих антиген, можно идентифицировать антитела, специфичные в отношении антигена. Гибридомы, секретирующие антитела, могут быть пересеяны, снова подвергнуты скринингу и, если они по-прежнему положительны в отношении продукции моноклональных антител, могут быть субклонированы путем метода предельных разведений. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* для получения антител в тканевой культуральной среде для характеристики.

Антитела также могут быть получены с помощью трансфектом клеток-хозяев с использованием, например, комбинации методов рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, которые хорошо известны в данной области (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Например, в одном воплощении интересующий(е) ген(ы), например, гены антител, можно лигировать в экспрессирующий вектор, например эукариотическую экспрессирующую плазмиду, такая как используемая системой экспрессии генов GS, описанная в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338 841, или другими системами экспрессии, хорошо известными в данной области. Очищенная плазида с клонированными генами антитела может быть введена в эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки CHO, клетки NS/0, клетки HEK293T или клетки HEK293, или альтернативно другие эукариотические клетки, такие как клетки растительного происхождения, грибные или дрожжевые клетки. Способ, используемый для введения этих генов, может представлять собой способы, описанные в данной области техники, такие как электропорация, липофектиновый, липофектаминный или другие. После

введения генов антител в клетки-хозяева можно идентифицировать и отобрать клетки, экспрессирующие антитела. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые затем могут быть амплифицированы для достижения необходимого уровня экспрессии и размножены для получения антител. Рекомбинантные антитела могут быть выделены и очищены из культуральных надосадочных жидкостей и/или клеток.

Альтернативно, клонированные гены антител могут быть экспрессированы в других экспрессирующих системах, включая прокариотические клетки, такие как микроорганизмы, например *E.coli*. Кроме того, антитела могут быть получены в организме трансгенных животных, отличных от человека, например, в молоке овец и кроликов или в яйцах кур, или в трансгенных растениях; см., например, Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; и Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Химеризация

Моноклональные антитела мышей можно использовать в качестве терапевтических антител для введения человеку, если они связаны с токсинами или радиоактивными изотопами. Сами по себе мышьиные антитела обладают высокой иммуногенностью для человека при многократном применении, что приводит к снижению терапевтического эффекта. В основном, иммуногенность опосредована константными областями тяжелой цепи. Иммуногенность мышьиных антител для человека может быть снижена или полностью исключена, если соответствующие антитела химеризированы или гуманизированы. Химерные антитела представляют собой антитела, различные части которых происходят от разных видов животных, такие как антитела, имеющие переменную область, полученную из мышьиного антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина. Химеризация антител достигается путем соединения переменных областей тяжелой и легкой цепей мышьиного антитела с константными областями тяжелой и легкой цепи человеческого антитела (например, как описано Kraus et al., в серии *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). В предпочтительном воплощении химерные антитела получают путем присоединения константной области легкой каппа-цепи антитела человека к переменной области легкой цепи мышьиного антитела. В еще одном предпочтительном воплощении химерные антитела могут быть получены путем присоединения константной области легкой цепи лямбда антитела человека к переменной области легкой цепи антитела мыши. Предпочтительными константными областями тяжелой цепи для получения химерных антител являются IgG1, IgG3 и IgG4. Другими предпочтительными

константными областями тяжелой цепи для получения химерных антител являются IgG2, IgA, IgD и IgM.

Гуманизация

Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно посредством аминокислотных остатков, расположенных в шести участках тяжелой и легкой цепей, определяющих комплементарность (CDR). По этой причине аминокислотные последовательности внутри CDR более разнообразны между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, путем конструирования экспрессирующих векторов, которые включают последовательности CDR из специфического встречающегося в природе антитела, привитые на каркасные последовательности другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; and Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК, которые содержат последовательности генов антител зародышевой линии. Эти последовательности зародышевой линии будут отличаться от последовательностей генов зрелых антител, поскольку они не будут включать полностью собранные переменные гены, которые образуются путем соединения V(D)J во время созревания В-клеток. Последовательности генов зародышевой линии также будут отличаться от последовательностей высокоаффинного вторичного репертуара антител у индивидуума равномерно по всей переменной области.

Способность антител связывать антиген можно определить с помощью стандартных анализов связывания (например, ELISA, вестерн-блоттинга, иммунофлуоресценции и проточного цитометрического анализа).

Для очистки антител выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся флаконах для очистки моноклональных антител. В качестве альтернативы антитела могут быть получены в биореакторах на основе диализа. Надсадочные жидкости можно отфильтровать и, при необходимости, сконцентрировать перед аффинной хроматографией с протеином G-сефарозой или протеином А-сефарозой. Элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS, а концентрацию можно определить по OD₂₈₀ с

использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C .

Чтобы определить, связываются ли выбранные моноклональные антитела с уникальными эпитопами, можно использовать сайт-направленный или мультисайт-направленный мутагенез.

Для определения изотипа антител можно проводить изотипический ELISA с использованием различных коммерческих наборов (например, Zymed, Roche Diagnostics). Лунки планшетов для микротитрования можно покрыть антителами против Ig мыши. После блокировки планшеты оставляют для реакции с моноклональными антителами или очищенными изотипическими контролями при температуре окружающей среды в течение двух часов. Затем лунки можно подвергнуть взаимодействию со специфичными к IgG1, IgG2a, IgG2b мыши или IgG3, IgA или IgM мыши зондами, конъюгированными с пероксидазой. После промывки планшеты можно обработать субстратом ABTS (1 мг/мл) и проанализировать при оптической плотности 405-650. В качестве альтернативы можно использовать набор IsoStrip для изотипирования мышинных моноклональных антител (Roche, кат. № 1493027), как описано производителем.

Для демонстрации наличия антител в сыворотке иммунизированных мышей или связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать проточную цитометрию. Клеточные линии, экспрессирующие антиген естественным образом или после трансфекции, и отрицательные контроли, не экспрессирующие антиген (выращенные в стандартных условиях роста), могут быть смешаны с различными концентрациями моноклональных антител в надосадочных жидкостях гибридомы или в PBS, содержащем 1% FBS, и могут инкубироваться при 4°C в течение 30 минут. После промывания APC- или Alexa647-меченное антитело против IgG может связываться с моноклональным антителом, связанным с антигеном, в тех же условиях, что и при окрашивании первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью проточной цитометрии с помощью прибора FACS, используя свойства света и бокового рассеяния для выделения отдельных живых клеток. Чтобы отличить антигенспецифические моноклональные антитела от неспецифических связующих в одном измерении, можно использовать способ котрансфекции. Клетки, транзитивно трансфицированные плазмидами, кодирующими антиген и флуоресцентный маркер, можно окрашивать, как описано выше. Трансфицированные клетки могут быть обнаружены в другом канале флуоресценции, чем клетки, окрашенные антителами. Поскольку большинство трансфицированных клеток экспрессируют оба трансгена, антиген-специфические моноклональные антитела связываются преимущественно с

клетками, экспрессирующими маркер флуоресценции, тогда как неспецифические антитела связываются в сравнимом соотношении с нетрансфицированными клетками. Альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии может быть использован (в дополнение или вместо) анализа проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии.

Для демонстрации наличия антител в сыворотке иммунизированных мышей или связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать анализ иммунофлуоресцентной микроскопии. Например, клеточные линии, экспрессирующие антиген либо спонтанно, либо после трансфекции, и отрицательные контроли, не экспрессирующие антиген, выращивают на предметных стеклах в стандартных условиях роста в среде DMEM/F12, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2 мМ L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки можно зафиксировать метанолом или параформальдегидом или оставить без обработки. Затем клетки могут вступить в реакцию с моноклональными антителами против антигена в течение 30 мин при 25°C. После промывки клетки можно подвергнуть реакции с меченым Alexa555 вторым антителом против IgG мыши (Molecular Probes) в тех же условиях. Затем клетки можно исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии.

Клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих антиген, и соответствующие отрицательные контроли могут быть приготовлены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS). После электрофореза разделенные антигены будут перенесены на нитроцеллюлозные мембраны, заблокированы и подвергнуты тестированию моноклональными антителами. Связывание IgG можно обнаружить с помощью антимишиного IgG, конъюгированного с пероксидазой, и проявить с помощью субстрата ECL.

Антитела могут быть дополнительно протестированы на реактивность с антигеном с помощью иммуногистохимии, хорошо известной специалистам в данной области, например, с использованием фиксированных параформальдегидом или ацетоном криосрезов или срезов, фиксированных параформальдегидом и залитых в парафин, приготовленных из ткани, не являющейся злокачественной, или из образцов ткани злокачественной опухоли, полученных от пациентов во время обычных хирургических процедур, или от мышей, несущих ксенотрансплантированные опухоли, инокулированные клеточными линиями, экспрессирующими антиген спонтанно или после трансфекции. Для иммуноокрашивания антитела, реагирующие на антиген, можно инкубировать с

конъюгированными с пероксидазой хрена козьими антителами против антител мыши или с козьими антителами против антител кролика (DAKO) в соответствии с инструкциями производителя.

Антитела можно тестировать на их способность опосредовать фагоцитоз и уничтожение клеток, экспрессирующих CLDN18.2. Тестирование активности моноклональных антител *in vitro* обеспечит первоначальный скрининг перед тестированием моделей *in vivo*.

Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ)

Вкратце, полиморфноядерные клетки (PMN), NK-клетки, моноциты, мононуклеарные клетки или другие эффекторные клетки от здоровых доноров могут быть очищены с помощью центрифугирования в Ficoll Nuраque для разделения по плотности с последующим лизисом контаминирующих эритроцитов. Промытые эффекторные клетки можно суспендировать в среде RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки или, альтернативно, с 5% инактивированной нагреванием сыворотки человека и смешать с мечеными ^{51}Cr клетками-мишенями, экспрессирующими CLDN18.2, при различных соотношениях эффекторных клеток и клеток-мишеней. Альтернативно, клетки-мишени могут быть помечены лигандом, усиливающим флуоресценцию (BATDA). Высокофлуоресцентный хелат европия с усиливающим лигандом, который высвобождается из мертвых клеток, можно измерить с помощью флуорометра. Другой альтернативный метод может использовать трансфекцию клеток-мишеней люциферазой. Добавленный желтый люцифер затем может окисляться только жизнеспособными клетками. Затем можно добавлять очищенные IgG против CLDN18.2 в различных концентрациях. Нерелевантный человеческий IgG можно использовать в качестве отрицательного контроля. Анализы можно проводить от 4 до 20 часов при 37°C в зависимости от используемого типа эффекторных клеток. Образцы могут быть проанализированы на цитолиз путем измерения высвобождения ^{51}Cr или присутствия хелата EuTDA в культуральной надосадочной жидкости. Альтернативно, люминесценция, возникающая в результате окисления желтого люцифера, может служить показателем жизнеспособности клеток.

Моноклональные анти-CLDN18.2 антитела также можно тестировать в различных комбинациях, чтобы определить, усиливается ли цитолиз множественными моноклональными антителами.

Комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ)

Моноклональные анти-CLDN18.2 антитела можно тестировать на их способность опосредовать КЗЦ с использованием множества известных методов. Например,

сыворотка, содержащая комплемент, может быть получена из крови известным специалистам в данной области образом. Для определения КЗЦ-активности mAb можно использовать различные способы. Например, можно измерить высвобождение ^{51}Cr или оценить повышенную проницаемость мембраны с помощью анализа исключения йодида пропидия (PI). Вкратце, клетки-мишени можно промыть и инкубировать в количестве 5×10^5 /мл с различными концентрациями mAb в течение 10-30 мин при комнатной температуре или при 37°C . Затем можно добавить сыворотку или плазму до конечной концентрации 20% (об./об.) и клетки инкубировать при 37°C в течение 20-30 мин. Все клетки из каждого образца могут быть добавлены к раствору PI в пробирке для FACS. Затем смесь можно немедленно проанализировать с помощью проточной цитометрии с использованием FACSArray.

В альтернативном анализе можно определить индукцию КЗЦ на прикрепленных клетках. В одном воплощении этого анализа клетки высевают за 24 часа до анализа с плотностью 3×10^4 /лунку в плоскодонные микротитрационные планшеты для тканевых культур. На следующий день ростовую среду удаляют и клетки инкубируют в трех повторах с антителами. Контрольные клетки инкубируют с питательной средой или питательной средой, содержащей 0,2% сапонина, для определения фонового лизиса и максимального лизиса, соответственно. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре надосадочную жидкость удаляют и к клеткам добавляют 20% (об./об.) плазмы или сыворотки человека в среде DMEM (предварительно подогретой до 37°C) и инкубируют еще 20 мин при 37°C . Все клетки из каждого образца добавляют к раствору йодида пропидия (10 мкг/мл). Затем надосадочные жидкости заменяют PBS, содержащим 2,5 мкг/мл бромистого этидия, и измеряют эмиссию флуоресценции при возбуждении при 520 нм при 600 нм с использованием Tecan Safire. Процент специфического лизиса рассчитывается следующим образом: % специфического лизиса = $(\text{флуоресценция образца} - \text{флуоресценция фона}) / (\text{флуоресценция максимального лизиса} - \text{флуоресценция фона}) \times 100$.

Индукция апоптоза и ингибирование клеточной пролиферации моноклональными антителами

Для проверки способности инициировать апоптоз моноклональные анти-CLDN18.2 антитела можно, например, инкубировать с CLDN18.2-положительными опухолевыми клетками, например, SNU-16, DAN-G, КАТО-III или опухолевыми клетками, трансфицированными CLDN18.2, при 37°C в течение около 20 часов. Клетки можно собрать, промыть буфером для связывания аннексина-V (BD biosciences) и инкубировать с аннексином V, конъюгированным с FITC или APC (BD biosciences), в течение 15 мин. в

темноте. Все клетки из каждого образца могут быть добавлены к раствору PI (10 мкг/мл в PBS) в пробирке для FACS и немедленно оценены с помощью проточной цитометрии (как указано выше). В качестве альтернативы, общее ингибирование клеточной пролиферации моноклональными антителами можно обнаружить с помощью имеющихся в продаже наборов. Набор для измерения пролиферации клеток DELFIA (Perkin-Elmer, кат. No. AD0200) представляет собой неизотопный иммуноанализ, основанный на измерении включения 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) во время синтеза ДНК пролиферирующих клеток в микропланшетах. Включенный BrdU обнаруживается с помощью моноклонального антитела, меченого европием. Чтобы обеспечить обнаружение антител, клетки фиксируют и денатурируют ДНК с помощью раствора Fix. Несвязанное антитело вымывают и добавляют индуктор DELFIA для диссоциации ионов европия из меченого антитела в раствор, где ионы образуют сильно флуоресцирующие хелаты с компонентами индуктора DELFIA. Измеренная флуоресценция с использованием флуориметрии с временным разрешением при обнаружении пропорциональна синтезу ДНК в клетке каждой лунки.

Доклинические исследования

Моноклональные антитела, которые связываются с CLDN18.2, также можно тестировать на модели *in vivo* (например, на иммунодефицитных мышах, несущих ксенотрансплантированные опухоли, инокулированные клеточными линиями, экспрессирующими CLDN18.2, например, DAN-G, SNU-16 или KATO-III, или линиями, экспрессирующими CLDN18.2 после трансфекции, например, HEK293), чтобы определить их эффективность в контроле роста опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Исследования *in vivo* после ксенотрансплантации экспрессирующих CLDN18.2 опухолевых клеток мышам с ослабленным иммунитетом или другим животным можно проводить с использованием описанных в данной заявке антител. Антитела можно вводить мышам без опухолей с последующей инъекцией опухолевых клеток для измерения действия антител на предотвращение образования опухолей или симптомов, связанных с опухолью. Антитела можно вводить мышам с опухолями для определения терапевтической эффективности соответствующих антител для уменьшения роста опухоли, метастазирования или симптомов, связанных с опухолью. Применение антител можно комбинировать с применением других веществ в качестве ингибиторов иммунных контрольных точек, цистостатических препаратов, ингибиторов фактора роста, блокаторов клеточного цикла, ингибиторов ангиогенеза или других антител для определения эффективности и потенциальной токсичности комбинаций. Для анализа токсических побочных эффектов, опосредованных антителами, животных можно

инокулировать антителами или контрольными реагентами и тщательно исследовать на наличие симптомов, возможно связанных с терапией антителами CLDN18.2. Возможные побочные эффекты применения антител к CLDN18.2 *in vivo*, в частности, включают токсичность в тканях, экспрессирующих CLDN18.2, включая желудок. Антитела, распознающие CLDN18.2 у человека и у других видов, например у мышей, особенно полезны для прогнозирования потенциальных побочных эффектов, опосредованных применением моноклональных антител к CLDN18.2 у людей.

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

Соединения и агенты, описанные в данной заявке, можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к составу, содержащему терапевтически эффективный агент, предпочтительно вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и/или эксципиентами. Указанная фармацевтическая композиция полезна для лечения, предотвращения или снижения тяжести заболевания или расстройства путем введения указанной фармацевтической композиции субъекту. Фармацевтическая композиция также известна в данной области как фармацевтический состав.

Фармацевтические композиции обычно представлены в одноразовой (единичной) дозированной лекарственной форме и могут быть приготовлены способами, известными сами по себе. Фармацевтическая композиция может быть, например, в форме раствора или суспензии.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением обычно применяют в «фармацевтически эффективном количестве» и в виде «фармацевтически приемлемого препарата».

Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксичности материала, который не влияет на действие активного компонента фармацевтической композиции.

Термин «фармацевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое обеспечивает искомую реакцию или искомый эффект в отдельной дозе или вместе с дополнительными дозами. В случае лечения конкретного заболевания искомая реакция предпочтительно связана с ингибированием течения заболевания. Это включает замедление прогресса заболевания и, в частности, прекращение или реверсию прогресса заболевания. Искомой реакцией при

лечении заболевания также может быть отсрочка начала или предотвращение наступления указанного заболевания или указанного состояния. Эффективное количество описанных в данной заявке композиций будет зависеть от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физиологическое состояние, размер и массу, продолжительность лечения, тип сопутствующей терапии (при наличии), конкретный способ введения и аналогичные факторы. Соответственно, вводимые дозы композиций, описанных в данной заявке, могут зависеть от множества таких параметров. В случае, когда реакция пациента недостаточна при исходной дозе, могут использоваться более высокие дозы (или эффективно более высокие дозы, достигнутые с помощью другого более точно локализованного пути введения).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать соли, буферы, консерванты и, возможно, другие терапевтические агенты. В одном воплощении фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и/или наполнителей.

Подходящие консерванты для применения в фармацевтических композициях по настоящему раскрытию включают, без ограничения указанным, хлорид бензалкония, хлорбутанол, парабен и тимеросал.

Используемый в данной заявке термин «эксципиент» относится к веществу, которое может присутствовать в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, но не является активным ингредиентом. Примеры эксципентов включают, без ограничения указанным, носители, связующие вещества, разбавители, смазывающие вещества, загустители, наполнители, поверхностно-активные вещества, консерванты, стабилизаторы, эмульгаторы, буферы, ароматизаторы или красители.

Термин «разбавитель» относится к разбавляющему и/или разжижающему агенту. Более того, термин «разбавитель» включает любое одну или несколько из жидкости, жидкой или твердой суспензии и/или смешивающей среды. Примеры подходящих разбавителей включают этанол, глицерин и воду.

Термин «носитель» относится к компоненту, который может быть природным, синтетическим, органическим, неорганическим, с которым скомбинирован активный компонент для облегчения, усиления или обеспечения возможности введения фармацевтической композиции. Используемый в данной заявке термин «носитель» может относиться к одному или нескольким совместимым твердым или жидким наполнителям, разбавителям или инкапсулирующим веществам, которые подходят для введения субъекту. Подходящий носитель включает, без ограничения указанным, стерильную воду, раствор Рингера, лактат Рингера, стерильный раствор хлорида натрия, изотонический

солевой раствор, полиалкиленгликоли, гидрогенизированные нафталины и, в частности, биосовместимые полимеры лактида, сополимеры лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена/полиоксипропилена. В одном воплощении фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает изотонический физиологический раствор.

Фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985).

Фармацевтические носители, эксципиенты или разбавители могут быть выбраны с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

В одном воплощении описанные в данной заявке фармацевтические композиции можно вводить внутривенно, внутриартериально, подкожно, внутрикожно или внутримышечно. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция приготовлена для местного или системного введения. Системное введение может включать энтеральное введение, которое включает абсорбцию через желудочно-кишечный тракт, или парентеральное введение. Используемый в данной заявке термин «парентеральное введение» относится к введению любым способом, отличным от желудочно-кишечного тракта, например, путем внутривенной инъекции. В предпочтительном воплощении фармацевтические композиции приготовлены для системного введения. В другом предпочтительном воплощении системное введение осуществляется путем внутривенного введения. Композиции можно вводить непосредственно в опухоль или лимфатический узел.

Термин «совместное введение», используемый в данной заявке, означает процесс, при котором разные соединения или композиции вводятся одному и тому же пациенту. Например, соединения или композиции можно вводить одновременно, по существу, в одно и то же время или последовательно.

Агенты и композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить пациентам, например, *in vivo*, для лечения или предотвращения различных нарушений, таких как раскрытые в данном изобретении. Предпочтительные пациенты включают людей, страдающих расстройствами, которые можно скорректировать или улучшить путем введения агентов и композиций, описанных в настоящей заявке. Сюда входят нарушения с участием клеток, характеризующихся экспрессией CLDN18.2.

Например, в одном воплощении агенты, описанные в настоящей заявке, можно использовать для лечения пациента с онкологическим заболеванием, например,

онкологическим заболеванием, таким как раскрытое в данной заявке, характеризующимся наличием клеток злокачественной опухоли, экспрессирующих CLDN18.2.

Фармацевтические композиции и способы лечения, описанные в соответствии с настоящим изобретением, также могут быть использованы для иммунизации или вакцинации с целью предотвращения раскрытого здесь заболевания.

Используемый в настоящей заявке термин «инструктивный материал» или «инструкции» включает публикацию, запись, диаграмму или любое другое средство выражения, которое можно использовать для сообщения о полезности композиций и способов по изобретению. Инструктивный материал набора по настоящему изобретению может быть, например, прикреплен к контейнеру, содержащему композиции по настоящему изобретению, или отправлен вместе с контейнером, содержащим композиции. Альтернативно, инструктивный материал может быть отправлен отдельно от контейнера с намерением, чтобы инструктивный материал и композиции использовались получателем совместно.

Настоящее изобретение далее описано с помощью следующих фигур и примеров, которые используются только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Благодаря описанию и примерам, следующие воплощения, которые включены в изобретение, доступны специалисту в данной области.

Фигура 1

Противоопухолевая активность IMAВ362 с анти-mPD-1 антителом и химиотерапией в модели сингенной мышинной модели рака желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2. Клетки карциномы желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 инокулировали (2×10^6 клеток на мышь) в правый бок самок мышей NMRI. Привитых мышей рандомизировали через 2 дня после прививки опухоли ($n = 16$ на группу). Тестовые агенты вводили в соответствии с соответствующей группой введения. Показана кривая роста опухоли для каждой группы введения с 0-го по 20-й день (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего).

Фигура 2

Анализ лепестковой диаграммы, представляющий индивидуальные кривые роста опухоли у всех получавших лечение мышей с 0-го по 20-й день. Вверху слева: количество регрессировавших опухолей в каждой группе лечения.

Примеры

Пример 1. Исследования эффективности комбинации анти-CLDN18.2 антител, химиотерапии и ингибиторов иммунной контрольной точки *in vivo*

Чтобы продемонстрировать, что комбинация анти-CLDN18.2 антитела, химиотерапии и ингибитора иммунных контрольных точек улучшает противоопухолевую активность по сравнению с комбинацией анти-CLDN18.2 антитела и химиотерапии, анти-CLDN18.2 антитела и ингибитора иммунной контрольной точки или химиотерапии и ингибитора иммунной контрольной точки *in vivo*, противоопухолевую активность ИМАВ362 в сочетании с химиотерапией и антителом против mPD-1 исследовали до 28-го дня или, до конечной точки выживания, до 84-го дня в сингенной модели с подкожной трансплантацией иммунокомпетентным аутбредным мышам Crl:NMRI(Han) с использованием клеток карциномы желудка CLS-103 с лентивирусной трансдукцией мышиным CLDN18.2 (CLS-103 LVT-murinCLDN18.2). Ритуксимаб использован в качестве изотипического контроля ИМАВ362.

Тестируемые агенты

- Анти-CLDN18.2 антитело: ИМАВ362 (Astellas Pharma Inc.)
- Контрольное антитело: ритуксимаб BS для внутривенной инфузии [КНК] 500 мг (Kyowa Kirin Co., Ltd., кат. № 22900AMX00971000)
- Химиотерапия: оксалиплатин (Yakult Honsha Co. Ltd., кат. № 22100AMX02236) и 5-фторурацил (Kyowa Kirin Co., Ltd, кат. № 22500AMX00515)
- Анти-mPD-1 антитело: InVivoMAb против мышинного PD-1, клон RMP1-14 (BioXCell, кат. № BE0146)
- Контрольное изотипическое антитело: контрольный изотипический IgG2a крысы InVivoMAb, антитело к тринитрофенолу, клон 2A3 (BioXCell, кат. № BE0089)

Мышиная модель рака желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2

CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 прививали подкожно в правый бок самкам мышей Crl:NMRI(Han) (в возрасте от 9 до 12 недель) в количестве 2×10^6 клеток/мышь. Мышей рандомизировали на основе объема опухоли, измеренного через 2 дня после приживления, на 5 групп (n = 16 в группе). День рандомизации определяется как день 0. ИМАВ362 или контрольное антитело Ритуксимаб вводят в дозе 800 мкг/мышь. Анти-mPD-1 антитело или контрольное изотипическое антитело вводят в дозе 100 мкг/мышь. Все антитела вводят внутривенно два раза в неделю, начиная с дня 0. Оксалиплатин и 5-фторурацил вводят внутривенно два раза в неделю, начиная с 0-го дня, при этом оксалиплатин вводят в дозе 1 мг/кг массы тела, а 5-фторурацил вводят в дозе 30 мг/кг массы тела. Опухоли измеряют два раза в неделю. Конечная точка исследования определяется как день 84. Объем опухоли определяется как длина \times ширина \times ширина \times 0,5. Ингибирование роста опухоли (TGI [%]) или скорость регрессии опухоли (TRR [%]) в каждой группе

рассчитывается с использованием уравнений, описанных ниже. Полная регрессия (CR) определяется, когда объем опухоли индивидуума регрессирует до нуля.

$$TGI [\%] = 100 \times (1 - \text{увеличение среднего объема опухоли в каждой группе\#} \div \text{увеличение среднего объема опухоли в контрольной группе\#})$$

\#: увеличение среднего объема опухоли [мм³] = средний объем опухоли по последнему измерению в каждой группе - средний объем опухоли при рандомизации (день 0)

$$TRR [\%] = 100 \times (1 - \text{средний объем опухоли при последнем измерении в каждой группе} \div \text{средний объем опухоли при рандомизации каждой группы})$$

Результаты

В этом исследовании опухолей на мышах CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 IMAB362 в сочетании с химиотерапией и анти-mPD-1 антителом может улучшать противоопухолевый эффект, который определяется количеством случаев CR или выживаемостью животных до 84-го дня синергическим образом. Как представлено в таблице ниже, количество случаев CR, TGI% (TRR%) и показатель выживаемости показаны для всех групп лечения. В первичной конечной точке комбинированное лечение, включающее 800 мкг IMAB362 + 1 мг/кг оксалиплатина + 30 мг/кг 5-фторурацила, 800 мкг IMAB362 + 100 мкг анти-mPD-1 антитела или 1 мг/кг оксалиплатина + 30 мг /кг 5-фторурацил + 100 мкг анти-mPD-1 антитела могут привести к 6 CR в группе из 12 мышей. Группа, получавшая лечение комбинацией IMAB362, химиотерапии и анти-mPD-1-антитела, может демонстрировать увеличенное количество мышей с CR и улучшенную выживаемость по сравнению с этими показателями в группе с двойным агентом, синергическим образом на мышинной модели. TGI% (TRR%) будет оцениваться экспериментально в момент времени, когда все животные во всех группах все еще будут присутствовать. Обработка 800 мкг IMAB362 + 1 мг/кг оксалиплатина + 30 мг/кг 5-фторурацила, 800 мкг IMAB362 + 100 мкг анти-mPD-1 антитела или 1 мг/кг оксалиплатина + 30 мг/кг 5-фторурацила + 100 мкг анти-mPD-1-антитела могут давать от 70% до 95% TGI, соответственно, тогда как комбинированная обработка, включающая 800 мкг IMAB362 + 1 мг/кг оксалиплатина + 30 мг/кг 5-фторурацила + 100 мкг анти- mPD-1 антитела может не только ингибировать, но даже регрессировать опухоль до 10% и более.

Обработка	Первичная конечная точка: Количество случаев CR (n=12)	Исследовательская конечная точка: TGI% (TRR%)	Исследовательская конечная точка: Выживание%
Контроль (ритуксимаб/носитель/из	1/12	-	0% - 10%

отип)			
IMAB362 / Chemo	5-6/12	70% - 95%	40% - 60%
IMAB362 / mPD-1	5-6/12	70% - 95%	40% - 60%
Chemo / mPD-1	5-6/12	70% - 95%	40% - 60%
IMAB362/ Chemo / mPD-1	9-11/12	(10% - 30%)	80% - 90%

Пример 2. Исследование эффективности *in vivo* комбинации анти-CLDN18.2 антител, химиотерапии и ингибиторов иммунной контрольной точки с использованием сингенной мышинной модели рака желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2

Чтобы оценить эффект тройной комбинированной терапии, анти-CLDN18.2 антитело, IMAB362, в сочетании с химиотерапией (5-фторурацил (5-ФУ) и оксалиплатин) и ингибитором иммунной контрольной точки исследовали с использованием сингенной мышинной модели опухоли, несущей клетки карциномы желудка мыши CLS-103, в которых мышиный CLDN18.2 трансдуцировали лентивирусом (CLS-103 LVT-murinCLDN18.2). Клетки карциномы желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 подкожно инокулировали иммунокомпетентным мышам Crl:NMRI(Han), и инокулированные мыши были рандомизированы на 5 групп (n = 16) с почти одинаковым средним объемом опухоли в каждой группе. Тестируемые агенты вводили в комбинациях, перечисленных ниже. Чтобы определить, повышает ли тройная комбинация анти-CLDN18.2 антитела, химиотерапии и ингибитора иммунной контрольной точки противоопухолевую эффективность по сравнению с двойными комбинациями *in vivo*, ингибирование роста опухоли исследовали до 20-го дня. Кроме того, количество регрессировавших опухолей сравнивали между каждой из групп лечения. Ритуксимаб использовали в качестве изотипического контроля IMAB362. В качестве носителя 5-ФУ и оксалиплатина использовали соответственно PBS и 5% глюкозу.

Тестируемые агенты

- Анти-CLDN18.2 антитело: IMAB362 (Astellas Pharma Inc.)
- Контрольное антитело: ритуксимаб BS для внутривенной инфузии [КНК] 500 мг (Kyowa Kirin Co., Ltd., кат. № 22900AMX00971000)
- Химиотерапия: 5-фторурацил (5-ФУ) (Kyowa Kirin Co., Ltd., кат. № 22500AMX00515), оксалиплатин (Yakult Honsha Co. Ltd., кат. № 22100AMX02236)
- Анти-mPD-1 антитело: InVivoMAb против мышинового PD-1, клон RMP1-14 (BioXCell, кат. № BE0146)
- Изотипическое контрольное антитело: изотипический контроль IgG2a крысы InVivoMAb, антитело к тринитрофенолу, клон 2A3 (BioXCell, кат. № BE0089)
- Носитель: PBS в качестве носителя для 5-FU, 5% глюкоза в качестве носителя для оксалиплатина.

Группы введения

- Группа 1: Контроль (контрольное антитело + PBS + 5% глюкоза + изотипическое контрольное антитело)
- Группа 2: Двойная комбинация анти-mPD-1 антитела + химиотерапии (контрольное антитело + 5-ФУ + оксалиплатин + анти-mPD-1 антитело)
- Группа 3: Двойная комбинация анти-CLDN18.2 антитела + анти-mPD-1 антитела (ИМАВ362 + PBS + 5% глюкоза + анти-mPD-1 антитело)
- Группа 4: Двойная комбинация анти-CLDN18.2 антитела + химиотерапии (ИМАВ362 + 5-FU + оксалиплатин + изотипическое контрольное антитело)
- Группа 5: Тройная комбинация анти-CLDN18.2 антитела + анти-mPD-1 антитела + химиотерапии (ИМАВ362 + 5-FU + оксалиплатин + анти-mPD-1 антитело)

Сингенная мышьяная модель рака желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2

Клетки карциномы желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 прививали подкожно в правый бок иммунокомпетентных самок мышей Crl:NMRI(Han) (10-недельного возраста) в количестве 2×10^6 клеток/животное. День прививки опухоли был определен как день 0. Мышей рандомизировали на основе объема опухоли, измеренного через 2 дня после приживления, на 5 групп ($n = 16$ в группе). ИМАВ362 или контрольное антитело, ритуксимаб, вводили в дозе 800 мкг/животное. Химиотерапия состояла из 5-ФУ и оксалиплатина, вводимых в дозах 10 мг/кг (3,33 мл/кг) и 0,5 мг/кг (3,33 мл/кг), соответственно. Анти-mPD-1 антитело или контрольное изотипическое антитело вводили в дозе 30 мкг/животное. Все тестируемые агенты вводили внутривентриально два раза в неделю, начиная со 2-го дня. Размеры опухолей измеряли два раза в неделю. Конечная точка измерения была на 20-й день. Объем опухоли определяли как длину \times ширину \times ширину $\times 0,5$. Ингибирование роста опухоли (TGI [%]) в каждой группе рассчитывали с использованием уравнения, описанного ниже. Регрессию опухоли определяли по описанному ниже определению.

$$\text{TGI [\%]} = 100 \times (1 - \frac{\text{увеличение среднего объема опухоли в каждой группе\#}}{\text{увеличение среднего объема опухоли в контрольной группе\#}})$$

\#: увеличение объема опухоли [мм³] = средний объем опухоли по последнему измерению в каждой группе - средний объем опухоли при рандомизации (день 2)

Регрессия: объем опухоли в последней точке измерения меньше исходного объема опухоли при рандомизации (2-й день)

Результаты

В этом противоопухолевом исследовании с использованием сингенной мышьяной модели рака желудка CLS-103 LVT-murinCLDN18.2 тройная комбинация ИМАВ362 с

химиотерапией и анти-mPD-1 антителом продемонстрировала улучшенную противоопухолевую активность по сравнению с группами двойной комбинации. На 20-й день тройная комбинация 800 мг ИМАВ362 + химиотерапия (10 мг/кг 5-ФУ + 0,5 мг/кг оксалиплатина) + анти-mPD-1 антитела привела к самой высокой частоте TGI 88% среди всех групп лечения, тогда как двойные комбинации химиотерапии (10 мг/кг 5-ФУ + 0,5 мг/кг оксалиплатина) + 30 мкг анти-mPD-1 антитела, 800 мкг ИМАВ362 + 30 мкг анти-mPD-1 антитела или 800 мкг ИМАВ362 + химиотерапия (10 мг/кг 5-ФУ + 0,5 мг/кг оксалиплатина) приводила к частоте TGI 65%, 78% и 54%, соответственно. Анализ лепестковой диаграммы, представляющий индивидуальные кривые роста опухоли у всех получавших лечение мышей, продемонстрировал заметную задержку роста опухоли в группе тройной комбинации. Кроме того, в каждой группе обработки определяли количество регрессировавших опухолей. Тройная комбинированная обработка привела к регрессии опухоли у 8 из 16 обработанных мышей по сравнению с 5 из 16 в группах с двойной комбинированной обработкой и 0 из 16 в контрольной группе.

Ингибирование роста опухоли и регрессия в каждой группе обработки

Группы	TGI (%)	Регрессия (n = 16)
1. Контроль	-	0
2. Химиотерапия + анти-mPD-1 антитело	65	5
3. ИМАВ362 + анти-mPD-1 антитело	78	5
4. ИМАВ362 + химиотерапия	54	5
5. Тройная комбинация	88	8

TGI: ингибирование роста опухоли; регрессия: количество регрессировавших опухолей из пула из 16 мышей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения рака у пациента, включающий введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

2. Способ ингибирования роста опухоли у пациента, имеющего рак, включающий введение пациенту анти-CLDN18.2 антитела, соединения платины, соединения фторпиримидина или его предшественника и ингибитора иммунной контрольной точки, выбранного из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что соединение платины представляет собой оксалиплатин.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что соединение фторпиримидина или его предшественник выбирают из группы, состоящей из фторурацила (5-ФУ), капецитабина, флоксуридина, тегафура, доксифлуридина и кармофура.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что соединение фторпиримидина или его предшественник представляет собой фторурацил (5-ФУ) или капецитабин.

6. Способ по любому из пп. 1-5, включающий введение оксалиплатина и 5-фторурацила или его предшественника.

7. Способ по любому из пп. 1-6, включающий введение оксалиплатина и 5-фторурацила или оксалиплатина и капецитабина.

8. Способ по любому из пп. 1-7, включающий введение фолиновой кислоты.

9. Способ по любому из пп. 1-8, включающий режим химиотерапии mFOLFOX6.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки выбран из анти-PD-1 антитела и анти-PD-L1 антитела.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (OPDIVO; BMS-936558), пембролизумаб (KEYTRUDA; MK-3475), пидилизумаб (CT-011), цемиплимаб (LIBTAYO, REGN2810), спартализумаб (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), достарлимаб (TSR-042), цетрелимаб (JNJ 63723283), торипалимаб (JS001), AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, тислелизумаб (BGB-A317), ABBV-181, BI 754091 или SHR-1210.

13. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что анти-PD-L1 антитело представляет собой атезолизумаб (TECENTRIQ; RG7446; MPDL3280A; R05541267), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559, авелумаб (bavencio), лодаполимаб (LY3300054), CX-072 (Proclaim-CX-072), FAZ053, KN035 или MDX-1105.

15. Способ по любому из пп. 1-12, включающий введение оксалиплатина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты и ниволумаба.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело связывается с первой внеклеточной петлей CLDN18.2.

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело опосредует гибель клеток посредством одного или нескольких из числа лизиса, опосредованного комплемент-зависимой цитотоксичностью (КЗЦ), лизиса, опосредованного антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ), индукции апоптоза и ингибирования пролиферации.

18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из:

(i) антитела, продуцируемого и/или получаемого из клона, депонированного под номером доступа DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 или DSM ACC 2810,

(ii) антитела, которое представляет собой химеризированную или гуманизированную форму антитела согласно (i),

(iii) антитела, обладающего специфичностью антитела согласно (i), и

(iv) антитела, содержащего антигенсвязывающий участок или антигенсвязывающий сайт, в частности варибельную область, антитела согласно (i) и предпочтительно обладающего специфичностью антитела согласно (i).

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 45-52 последовательности, представленной SEQ ID NO: 17, CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 70-77 последовательности, представленной SEQ ID NO: 17, CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 116-126 последовательности, представленной SEQ ID NO: 17, CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащий последовательность в положениях 47-58 последовательности,

представленной SEQ ID NO: 24, CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность в положениях 76-78 последовательности, представленной SEQ ID NO: 24, и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащий последовательность в положениях 115-123 последовательности, представленной SEQ ID NO: 24.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 32, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 39, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 13 или 52, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

23. Способ по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 17 или 51, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислоты последовательность или его функциональный вариант.

24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что анти-CLDN18.2 антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность, представленную SEQ ID NO: 24, или ее функциональный вариант, или фрагмент аминокислотной последовательности или его функциональный вариант.

25. Способ по любому из пп. 1-24, включающий введение анти-CLDN18.2 антитела в дозе до 1000 мг/м².

26. Способ по любому из пп. 1-25, включающий многократное введение анти-CLDN18.2 антитела в дозе от 300 до 600 мг/м².

27. Способ по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что рак является положительным по CLDN18.2.

28. Способ по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что рак представляет собой аденокарциному, в частности аденокарциному в прогрессирующей стадии.

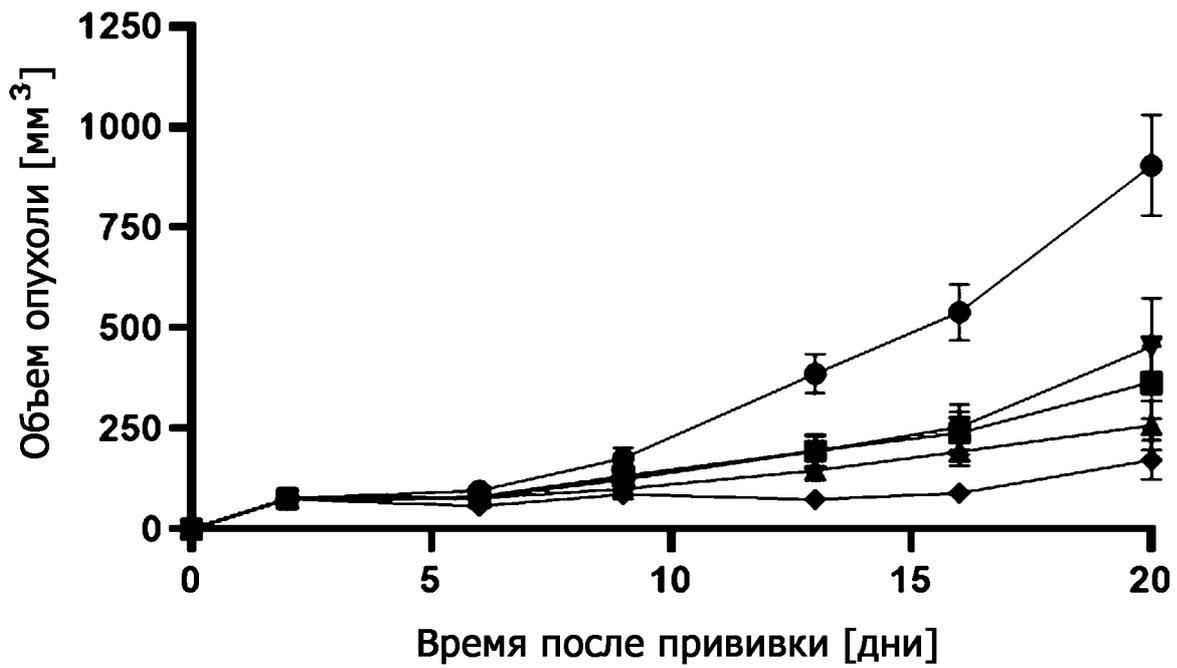
29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, в частности, нижнего отдела пищевода, рака желудочно-пищеводного соединения и гастроэзофагеального рака.

30. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что рак представляет собой метастатическую или местно распространенную CLDN18.2-положительную, HER2-отрицательную аденокарциному желудка и желудочно-пищеводного соединения.

31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что CLDN18.2 имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1.

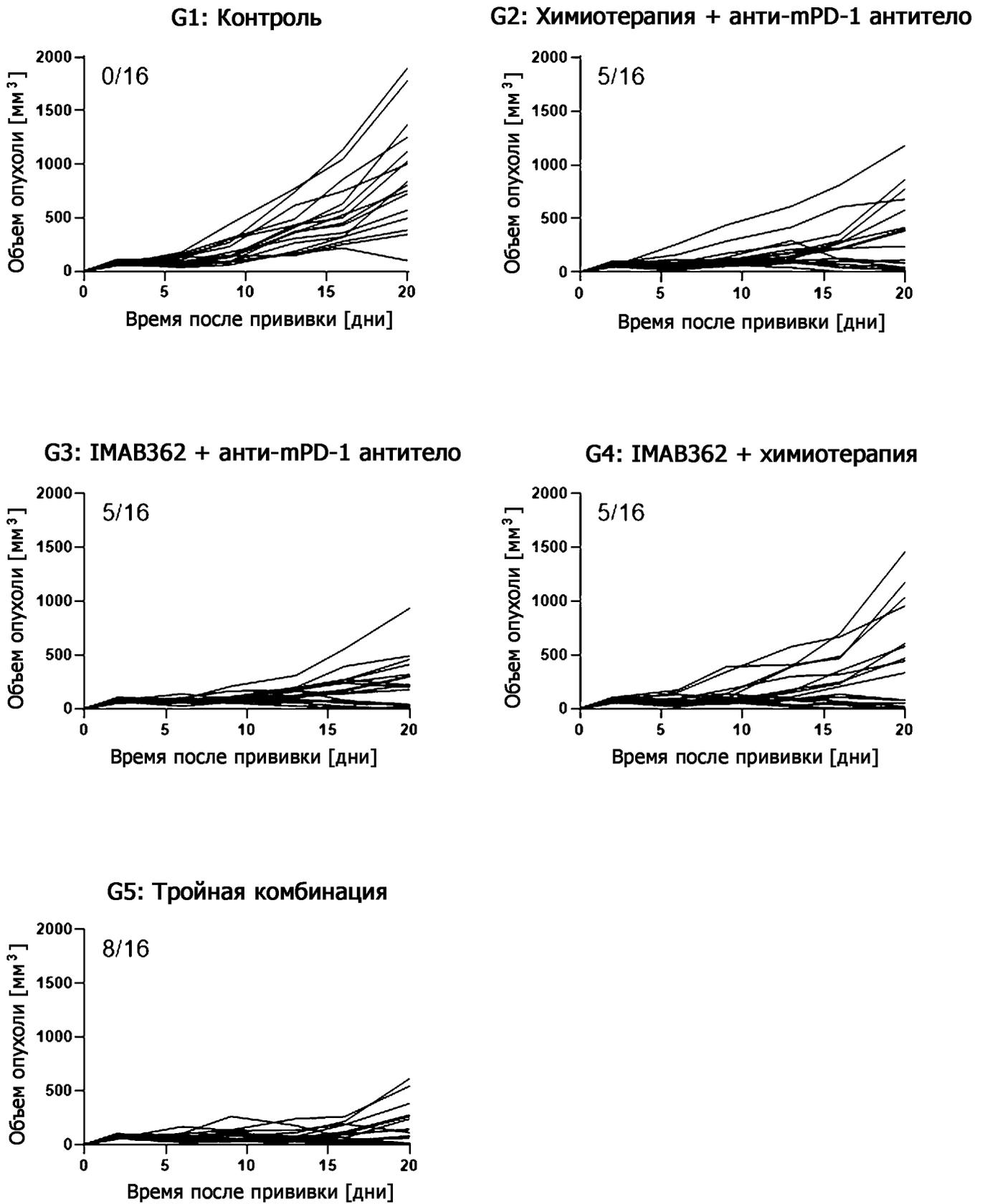
32. Медицинский препарат, содержащий анти-CLDN18.2 антитело, соединение платины, соединение фторпиримидина или его предшественник и ингибитор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибитора PD-1 и ингибитора PD-L1.

33. Медицинский препарат по п. 32, дополнительно содержащий печатные инструкции по применению препарата при лечении рака.



- 1. Контроль
- 2. Химиотерапия + анти-mPD-1 антитело
- ▲ 3. IMAB362 + анти-mPD-1 антитело
- ▼ 4. IMAB362 + химиотерапия
- ◆ 5. Тройная комбинация

ФИГ. 1



Фиг. 2