



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118664** (13) **C2**  
(51) МПК**C07K 16/30** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 1/18** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2015 08994**

(22) Дата подання заявки: **18.02.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.02.2019**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **PCT/EP2013/000505**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.02.2013**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **11.04.2016, Бюл.№ 7**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.02.2019, Бюл.№ 4**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2014/000433, 18.02.2014**

(72) Винахідник(и):  
**Сахін Угур (DE),  
Тюречі Езлем (DE),  
Мітнахт-Краус Ріта (DE),  
Воль Штефан (DE),  
Якобс Штефан (DE),  
Хайнц Корнелія (DE)**

(73) Власник(и):  
**ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ,**  
An der Goldgrube 12, 55131 Mainz, Germany (DE),  
**ТРОН - ТРАНСЛАЦІОНАЛЕ ОНКОЛОГІ АН  
ДЕР УНІВЕРЗІТЕТСМЕДІЦІН ДЕР  
ЙОХАННЕС ГУТЕНБЕРГ-УНІВЕРЗІТЕТ  
МАЙНЦ ГЕМАЙННЮТЦІГЕ ГМБХ,**  
Freiligrathstr. 12, 55131 Mainz, Germany (DE)

(74) Представник:  
**Слободянюк Тарас Олександрович,  
реєстр. №217**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 2007059997 A1, 31.05.2007  
WO 2013174404 A1, 28.11.2013  
CARTWRIGHT THOMAS et al. Cancer of the pancreas: are we making progress? A review of studies in the US Oncology Research Network. Cancer control : Journal of the moffitt cancer center, 2008, Vol. 15, no. 4, P. 308 - 313  
TANAKA M. et al. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. Journal of histochemistry & cytochemistry, 2011), Vol. 59, no. 10, P. 942 - 952  
SAHIN UGUR et al. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. Clinical cancer research, The american association for cancer research, US, 2008, Vol. 14, no. 23, P. 7624 - 7634  
NIIMI T. et al. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodo. Molecular and cellular biology, American society for microbiology, Washington, US, 2001, Vol. 21, no. 21, P. 7380 - 7390  
HEINER SCHÄFER et al. Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma. Cancer letters, 2012, Vol. 319, no. 1, P. 66 - 82  
STEFAN WÖLL et al. Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms. International journal of cancer, 2013, P. 731 - 739

**(54) КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИТІЛА ПРОТИ КЛАУДИНУ 18.2 ТА ГЕМЦИТАБІНУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ****(57) Реферат:****UA 118664 C2**

Винахід стосується застосування антитіла, яке зв'язується з CLDN18.2 у комбінації з гемцитабіном для лікування раку підшлункової залози.

## Рівень техніки

Рак підшлункової залози є одним із самих летальних видів раку. Смертність досягає 100 % через схильність до раннього утворення метастаз й внаслідок того, що хвороба є дуже стійкою до променевої й хіміотерапії. Враховуючи, що щороку діагностується 27 000 нових випадків у Північній Америці й 68 000 у Європі, існує постійна потреба в розробці нових стратегій лікування для зниження смертності хворих на рак підшлункової залози.

Сплайс-варіант 2 молекули щільних контактів клаудину 18 (claudin 18.2, або CLDN18.2) входить до родини білків щільних контактів - клаудинів. CLDN18.2 - трансмембранний білок в 27,8 кДа, який містить чотири трансмембранні домени із двома невеликими позаклітинними петлями. У нормальних тканинах експресія CLDN18.2 методом ЗТ-ПЛР не виявлена, за винятком шлунка. Імуногістохімія за допомогою специфічних до CLDN18.2 антитіл показала, що позитивну реакцію дає єдина тканина - шлунок. CLDN18.2 є досить вибірковою антигеном шлункової лінії, яка експресується винятково в короткоживучих диференційованих епітеліальних клітинах шлунка. CLDN18.2 зберігається при злоякісній трансформації й тому часто виступає на поверхні ракових клітин шлунка людини. Крім того, цей пан-пухлинний антиген активується ектопічно на істотному рівні в клітинах аденокарциноми стравоходу, підшлункової залози й легенів.

Фірмою Ganymed Pharmaceuticals AG було розроблено химерне антитіло IMAB362 типу IgG1, спрямоване проти CLDN18.2. IMAB362 розпізнає перший позаклітинний домен (ECD1) CLDN18.2 з високою спорідненістю й специфічністю. IMAB362 не зв'язується з іншими представниками родини, включаючи близькоспоріднений сплайс-варіант 1 клаудину 18 (CLDN18.1). IMAB362 проявляє сильну специфічність до пухлинних клітин і в ньому сполучаються чотири незалежні високоактивні механізми дії. Після зв'язування з мішенню IMAB362 опосередковує знищення клітин за допомогою ADCC, CDC та індукції апоптоза, спричиненого перехресними зшивками мішені на поверхні пухлинних клітин і безпосереднім інгібуванням проліферації. При цьому IMAB362 ефективно спричиняє лізис CLDN18.2-позитивних клітин, у тому числі клітин ракових ліній шлунка людини *in vitro* і *in vivo*.

Токсичність і РК/ТК-профіль IMAB362 ретельно досліджувалися на мишах і яванських макаках, включаючи дослідження з виявлення дозового діапазону, 28-денні дослідження з токсичності повторних доз на макаках і 3-місячні дослідження з токсичності повторних доз на мишах. Як миші (найбільша тривалість обробки при щотижневому введенні – 3 місяці, максимальний рівень доз – 400 мг/кг), так і яванські макаки (до 5 щотижневих уведень аж до 100 мг/кг) добре переносили повторні дози IMAB362 в/в. Не відзначалося ніяких ознак системної або місцевої токсичності. Зокрема, у жодному дослідженні з токсичності не відзначалося шлункової токсичності. IMAB362 не викликає імунної активації й вивільнення цитокінів. Не відзначалося ніяких негативних ефектів на репродуктивні органи в самців або самок. IMAB362 не зв'язується з тими тканинами, у яких відсутні мішені. Дослідження з біорозподілення на мишах показали, що відсутність шлункової токсичності, швидше за все, обумовлена компартменталізацією щільних контактів на люмінальній стороні нормального епітелію шлунка, що сильно ускладнює доступ до епітопів IMAB362.

Клінічні дослідження IMAB362 перебувають на початковій стадії. Проводилася I фаза клінічних випробувань на людях. По 3 пацієнти в 5 дозових групах (33 мг/м<sup>2</sup>, 100 мг/м<sup>2</sup>, 300 мг/м<sup>2</sup>, 600 мг/м<sup>2</sup>, 1000 мг/м<sup>2</sup>) одержували внутрішньовенно одноразові дози IMAB362 і знаходились під спостереженням протягом 28 днів. IMAB362 дуже добре переносився, при цьому не було істотних зауважень щодо безпеки в пацієнтів. В одного пацієнта всі вимірювані пухлинні маркери значно зменшувалися протягом 4 тижнів після лікування. У поточній фазі IIa клінічних випробувань IMAB362 вводиться неодноразово.

Далі тут наводяться дані, які свідчать про те, що хіміотерапевтичні засоби можуть стабілізувати або підсилювати експресію CLDN18.2 на поверхні ракових клітин підшлункової залози, приводячи до підвищення доступності CLDN18.2 для антитіл проти CLDN18.2 типу IMAB362. Спостерігалася синергійна дія антитіл проти CLDN18.2 типу IMAB362 з певними хіміотерапевтичними препаратами, зокрема, з хіміотерапевтичними препаратами, які використовуються для лікування раку підшлункової залози. При хіміотерапевтичній обробці ракові клітини людини стають більш сприйнятливими до індукованого антитілами мішень-специфічного знищення. На моделях пухлин у мишей контроль пухлин за допомогою антитіл проти CLDN18.2 плюс хіміотерапії перевершує такий контроль за допомогою одних лише антитіл проти CLDN18.2 як єдиного засобу.

## Сутність винаходу

Даним винаходом у загальному передбачена комбінована терапія для ефективного лікування й/або профілактики захворювань, пов'язаних із клітинами, які експресують CLDN18.2,

включаючи такі ракові захворювання, як рак шлунка, рак стравоходу, рак підшлункової залози, рак легенів типу недрібноклітинного раку легенів (NSCLC), рак яєчників, рак товстої кишки, рак печінки, рак голови й шиї й рак жовчного міхура, а також їх метастазів, зокрема метастазів рака шлунка типу пухлин Крукенберга, метастазів в очеревині й метастазів у лімфатичних вузлах.

5 Переважно раковими захворюваннями є рак підшлункової залози та його метастази.

В одному аспекті даного винаходу передбачений спосіб лікування або профілактики раку підшлункової залози в пацієнтів, який передбачає введення пацієнтам (i) антитіла, яке має здатність зв'язуватись з CLDN18.2, та (ii) засобу, який стабілізує або посилює експресію, тобто рівень CLDN18.2. Експресія CLDN18.2 переважно відбувається на клітинній поверхні ракових клітин. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може вводитися до, одночасно з

10 або після введення антитіла, яке має здатність зв'язуватись з CLDN18.2, або в комбінації з ним. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може бути цитотоксичним і/або цитостатичним засобом. В одному втіленні засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, включає засіб, який індукує зупинку клітинного циклу або нагромадження клітин в одній або декількох фазах клітинного циклу, бажано в одній або декількох фазах клітинного циклу, відмінних від фази G1, типу фази S, фази G2 або їх комбінації або комбінації фази S або фази G2 з фазою G1. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може включати засіб, обраний із групи, яка складається з аналогів нуклеозидів, сполук платини, аналогів камптотецину й таксанів, їх форм проліків, солей і комбінацій. Аналоги нуклеозидів можна

20 вибирати із групи, яка складається з гемцитабіну, 5-фторурацилу, їх форм проліків і солей. Сполуки платини можна вибирати із групи, яка складається з оксаліплатину, цисплатину, їх форм проліків і солей. Аналоги камптотецину можна вибирати із групи, яка складається з іринотекану, топотекану, їх форм проліків і солей. Таксани можна вибирати із групи, яка складається з паклітакселю, доцетакселю, їх форм проліків і солей. Засіб, який стабілізує або

25 посилює експресію CLDN18.2, може включати засіб, обраний із групи, яка складається з гемцитабіну, 5-фторурацилу, оксаліплатину, іринотекану, паклітакселю, їх форм проліків, солей і комбінацій. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може включати комбінацію з оксаліплатину й 5-фторурацилу або їх форм проліків, комбінацію із цисплатину й 5-фторурацилу або їх форм проліків, комбінацію із щонайменше одного токсану й оксаліплатину, комбінацію із щонайменше одного токсану й цисплатину, комбінацію із щонайменше одного токсану й 5-фторурацилу або його форм проліків, або комбінацію із щонайменше одного аналога камптотецину й 5-фторурацилу або його форм проліків. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може включати комбінацію з гемцитабіну й оксаліплатину, комбінацію з гемцитабіну й цисплатину, комбінацію з гемцитабіну й карбоплатину або

35 комбінацію з оксаліплатину, 5-фторурацилу або його форм проліків і іринотекану. Відповідно, спосіб запропонований винаходом може включати введення комбінації з гемцитабіну й оксаліплатину, комбінації з гемцитабіну й цисплатину, комбінації з гемцитабіну й карбоплатину або комбінації з оксаліплатину, 5-фторурацилу або його форм проліків і іринотекану. В одному втіленні спосіб запропонований винаходом передбачає введення фолінової кислоти, 5-фторурацилу або його форм проліків, іринотекану й оксаліплатину. Засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, може включати засіб, який індукує імуногенну загибель клітин. Засіб, який індукує імуногенну загибель клітин, може включати оксаліплатин.

У наступному аспекті даного винаходу передбачений спосіб лікування або профілактики раку в пацієнтів, який передбачає введення пацієнтам (i) антитіла, яке має здатність зв'язуватись з CLDN18.2, і (ii) гемцитабіну. В одному втіленні рак вибирають із групи, яка складається з раку шлунка, рака стравоходу, рака підшлункової залози, рака легенів, рака яєчників, рака товстої кишки, рака печінки, рака голови й шиї, рака жовчного міхура і їх метастазів. Ракове захворювання може бути презентовано пухлиною Крукенберга, метастазами в очеревині й/або метастазами в лімфатичних вузлах. В одному втіленні рак представлений аденокарциномою, зокрема, пізньою стадією аденокарциноми. В одному втіленні рак представлений раком підшлункової залози.

В одному втіленні спосіб запропонований винаходом додатково включає введення засобу, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ . В одному втіленні Т-клітини  $\gamma\delta$  представлені Т-клітинами V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. В одному втіленні засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ , представлений бісфонатом типу азотовмісного бісфоната (амінобісфоната). В одному втіленні засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ , вибирається із групи, яка складається із золедронової кислоти, клодронової кислоти, ібандронової кислоти, памідронової кислоти, ризедронової кислоти, мінодронової кислоти, олпадронової кислоти, алендронової кислоти, інкадронової кислоти та їх солей. В одному втіленні засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ , вводиться в комбінації з інтерлейкіном-2.

60 Спосіб запропонований винаходом може додатково передбачати введення щонайменше ще



одного хіміотерапевтичного засобу, який може бути цитотоксичним засобом.

Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, може зв'язуватися з нативними епітопами CLDN18.2, які перебувають на поверхні живих клітин. В одному втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN18.2.

В одному втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, опосередковує знищення клітин за одним або кількома механізмами із числа опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC) лізису, індукції апоптоза й інгібування проліферації. В одному втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є моноклональним, химерним або гуманізованим антитілом або фрагментом антитіла. В одному втіленні антитіло опосередковує знищення клітин при зв'язуванні із клітинним CLDN18.2, зокрема, з CLDN18.2, який експресується клітинами на їхній клітинній поверхні, причому клітини бажано представлені раковими клітинами описаних тут типів ракових клітин. В одному втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, обраним із групи, яка складається з (i) антитіл, вироблених і/або отриманих із клону, депонованого під номером доступу DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 або DSM ACC2810, (ii) антитіл, що представляють собою химеризовані або гуманізовані форми антитіл за п. (i), (iii) антитіл, які проявляють специфічність антитіл за п. (i), і (iv) антитіл, які містять антигензв'язувальну ділянку або антигензв'язувальний сайт, зокрема, варіабельну область антитіл за п. (i), і бажано антитіл, які проявляють специфічність, за п. (i). В одному втіленні антитіло кон'юговане з терапевтичним засобом, як то токсином, радіоізотопом, лікарським препаратом або цитотоксичним засобом.

В одному втіленні спосіб запропонований винаходом передбачає введення антитіла, яке має здатність зв'язуватись з CLDN18.2, у дозі аж до 1000 мг/м<sup>2</sup>. В одному втіленні спосіб запропонований винаходом передбачає кількаразове введення антитіла, яке має здатність зв'язуватись з CLDN18.2, у дозі від 300 до 600 мг/м<sup>2</sup>.

Відповідно до винаходу, CLDN18.2 бажано має амінокислотну послідовність згідно SEQ ID NO: 1.

В одному втіленні описаний тут рак є CLDN18.2-позитивним. В одному втіленні ракові клітини описаного тут раку є CLDN18.2-позитивними. В одному втіленні ракові клітини описаного тут раку експресують CLDN18.2 на своїй клітинній поверхні.

В одному втіленні описаний тут рак підшлункової залози включає первинний рак, рак на пізніх стадіях або метастатичний рак або їх комбінації типу комбінації первинного раку підшлункової залози й метастатичного раку. В одному втіленні способи запропоновані винаходом призначені для одночасного лікування первинного раку й рака здатного утворювати метастази, як то первинного раку підшлункової залози й метастатичного раку підшлункової залози. В одному втіленні рак здатний утворювати метастази включає метастази в лімфатичних вузлах, яєчниках, печінці або легенях або їх комбінації. В одному втіленні рак підшлункової залози включає рак проток підшлункової залози. В одному втіленні рак підшлункової залози включає аденокарциному або карциному або їх комбінацію. В одному втіленні рак підшлункової залози включає аденокарциному проток, аденокарциному слизової, нейроендокринну карциному або ацинозно-клітинну карциному або їх комбінації. В одному втіленні рак підшлункової залози частково або повністю не піддається лікуванню гемцитабіном типу монотерапії гемцитабіном. В одному втіленні профілактика раку підшлункової залози включає запобігання рецидиву рака підшлункової залози.

В одному втіленні у пацієнта, що підлягає лікуванню відповідно до винаходу, була операція із приводу раку підшлункової залози. В одному втіленні в пацієнта є передракові ураження підшлункової залози, зокрема, передракові ураження підшлункової залози, які включають виникнення злоякісних гістологічних змін у протоках підшлункової залози. У цих втіленнях способи запропоновані винаходом бажано спрямовані на запобігання розвитку злоякісного раку підшлункової залози.

У наступному аспекті даного винаходу передбачені лікарські препарати для лікування або профілактики раку підшлункової залози, які включають: (i) антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і (ii) засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2. Лікарські препарати даного винаходу можуть додатково містити засіб, який стимулює Т-клітини уД. Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, а також, необов'язково, засіб, який стимулює Т-клітини уД, можуть перебувати в лікарському препараті у вигляді суміші або окремо один від одного. Лікарський препарат може бути представлений у вигляді набору, що включає перший контейнер, який

містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і другий контейнер, який містить засіб, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, а також, необов'язково, контейнер, який містить засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ . Лікарський препарат може додатково супроводжуватися друкованими інструкціями щодо застосування препарату для лікування або профілактики раку підшлункової залози, зокрема, щодо застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні втілення лікарських препаратів, зокрема, антитіл, які мають здатність зв'язуватися з CLDN18.2, засобів, що стабілізують або посилюють експресію CLDN18.2, і засобів, що стимулюють Т-клітини  $\gamma\delta$ , уже описані вище для способів запропонованих винаходом.

В окремому аспекті даного винаходу передбачені лікарські препарати, що включають: (i) антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і (ii) гемцитабін. Лікарські препарати даного винаходу можуть додатково містити засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ . Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і гемцитабін, а також, необов'язково, засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ , можуть перебувати в лікарському препараті у вигляді суміші або окремо один від одного. Лікарський препарат може слугувати для лікування або профілактики раку, як то рак підшлункової залози. Лікарський препарат може бути представлений у вигляді набору, який включає перший контейнер, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і другий контейнер, який містить гемцитабін, а також, необов'язково, контейнер, який містить засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ . Лікарський препарат може додатково супроводжуватися друкованими інструкціями із застосування препарату для лікування або профілактики раку типу рака підшлункової залози, зокрема, щодо застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні втілення лікарських препаратів, зокрема, антитіл, які мають здатність зв'язуватися з CLDN18.2, засобів, що стабілізують або посилюють експресію CLDN18.2, і засобів, що стимулюють Т-клітини  $\gamma\delta$ , уже описані вище для способів запропонованих винаходом.

Даним винаходом також передбачені описані тут засоби, такі як антитіла, які мають здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і/або засоби, що стабілізують або посилюють експресію CLDN18.2, для застосування в описаних тут способах. Наприклад, даним винаходом також передбачені антитіла, які мають здатність зв'язуватися з CLDN18.2, для введення в комбінації із засобом типу гемцитабіну, що стабілізують або посилюють експресію CLDN18.2, а також, необов'язково, засобом, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ .

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

Короткий опис фігур

Фіг. 1. Лентивірусний вектор, який використовують для трансдукції клітин ракових ліній підшлункової залози. CLDN18.2 людини клонували нижче промотору EF1 $\alpha$ . Експресійну касету вставляли між довгими кінцевими повторами (5' і 3-LTR), які сприяють упакуванню й зворотній транскрипції вірусної мРНК. RSV: вірус саркоми Rous забезпечує Tat-незалежне одержання вірусної мРНК. Amp: ген стійкості до ампіциліну. PGKp: промотор бластицидіну. WPRE: посттранскрипційний регуляторний елемент woodchuck; підвищує експресію трансгена. LTR: довгий кінцевий повтор, сприяє упакуванню вірусу. SV40A сприяє термінації транскрипції й поліаденілюванню мРНК. pUC: скелет бактеріального вектора. Bla: промотор ампіциліну.

Фіг. 2. Аналіз утворення метастаз клітин підшлункової залози в легенях миші. Схема розтину легенів у мишей після в/в введення їм ракових клітин підшлункової залози.

Фіг. 3. Експресія CLDN18.2 у нормальних і ракових тканинах підшлункової залози. Фарбування фіксованої формаліном і залитої в парафін (FFPE) нормальної тканини підшлункової залози (A) і тканини аденокарциноми підшлункової залози (B) за допомогою моноклонального антитіла 35-22A миші (0,2 мкг/мл). Контрастне фарбування гематоксиліном (2:00 хв.). Збільшення  $\times 200$ .

Фіг. 4. Експресія CLDN18.2 у нормальних й передракових тканинах підшлункової залози. Фарбування за допомогою 43-14A різних передракових структур у нормі (A) і PanIN1; PanIN2 (B); PanIN3 (C). Збільшення  $\times 200$ .

Фіг. 5. Пілотне дослідження. Кореляція між інтенсивністю сигналу CLDN18.2 і кількістю позитивних пухлинних клітин при аналізі первинних пухлин підшлункової залози. Кожна точка представляє випадок первинного раку підшлункової залози при аналізі шляхом фарбування FFPE-зрізів за допомогою моноклонального антитіла 35-22A миші (0,2 мкг/мл). Пунктирною лінією відзначене значення в 10 %.

Фіг. 6. Пілотне дослідження. Експресія CLDN18.2 у тканинах первинних і метастатичних пухлин підшлункової залози. Фарбування FFPE-зрізів тканини (3 мкм) за допомогою моноклонального антитіла 35-22A миші в первинній пухлині аденокарциноми (A) і метастазах у

лімфатичних вузлах (B). Контрастне фарбування гематоксиліном (Mayers).

Фіг. 7. Основне дослідження. Кореляція між інтенсивністю сигналу CLDN18.2 і кількістю позитивних пухлинних клітин при аналізі первинних пухлин підшлункової залози. Кожна точка представляє випадок первинної пухлини аденокарциноми проток підшлункової залози (чорні кружечки) або первинної нейроендокринної пухлини (світлі кружечки) при аналізі шляхом фарбування FFPE-зрізів за допомогою моноклонального антитіла 43-14A миші (0,2 мкг/мл).

Фіг. 8. Кореляція між інтенсивністю сигналу CLDN18.2 і кількістю позитивних пухлинних клітин при аналізі метастазів підшлункової залози. Кожна точка представляє випадок метастазів рака підшлункової залози в лімфатичних вузлах (чорні кружечки) або печінки (світлі кружечки) при аналізі шляхом фарбування FFPE-зрізів за допомогою моноклонального антитіла 43-14A миші (0,2 мкг/мл). Пунктирною лінією відзначене значення в 10 %.

Фіг. 9. Експресія CLDN18.2 у тканинах первинних і метастатичних пухлин підшлункової залози. Фарбування FFPE-зрізів тканини (3 мкм) за допомогою моноклонального антитіла 43-14A миші в первинних пухлинах аденокарциноми (A, C, E) і їх метастазах у лімфатичних вузлах (B, D, F). Контрастне фарбування зрізів гематоксиліном (Mayers).

Фіг. 10. Графічний аналіз. Експресія CLDN18.2 у тканинах первинних пухлин підшлункової залози й відповідних метастазів у лімфатичних вузлах.

Фіг. 11. Експресія CLDN18.2 у тканинах первинних пухлин підшлункової залози й відповідних метастазів. Фарбування FFPE-зрізів тканини (3 мкм) з первинної аденокарциноми (A), метастазів у печінці (B) і метастазів у лімфатичних вузлах (C) за допомогою моноклонального антитіла 43-14A миші. Контрастне фарбування зрізів гематоксиліном (Mayers). Збільшення  $\times 200$ .

Фіг. 12. Рівень мРНК CLDN18.2 у клітинних лініях карциноми підшлункової залози. (A) Аналіз експресії методом кількісної ПЛР у різних лініях клітин СА підшлункової залози, трансдукованих лентивірусом (LVT) лініях клітин (сірі стовпчики), лінії клітин рака шлунка KATO-III (позитивний контроль) і лінії клітин рака молочної залози SKBR-3 (негативний контроль). Транскрипти CLDN18.2 ампліфікували за допомогою геноспецифічних праймерів. Ендогенні лінії клітин, що дають відносний рівень експресії більш ніж  $1 \times 10^5$ , оцінювали як CLDN18.2-позитивні (заштриховані стовпчики). NTC: контрольний зразок з  $H_2O$ . Планки похибок: середнє + SD. (B-D) Аналіз залежності від пасажу експресії CLDN18.2 у клітинах Patu8988S (B), Panc05.04 (C) і зазначених лініях LVT-клітин (D). Номер пасажу зазначений під кожним стовпчиком.

Фіг. 13. Рівень білка CLDN18.2 у клітинних лізатах ліній клітин карциноми підшлункової залози. Білки розділяли на 12,5 % SDS-PAGE. Вестерн-блотинг проводили за допомогою антитіла CLDN18, що розпізнає C-кінцеву ділянку CLDN18.1 і CLDN18.2 (Zymed-MID), і за допомогою контрольного антитіла, що розпізнає  $\beta$ -актин. Час експозиції - 140 с (Pierce Supersignal West Dura) і 20 с (Pierce Supersignal West Pico), відповідно. (A) Виявлення CLDN18 у лізатах клітинних ліній підшлункової залози, лізатах клітин позитивного контролю (HEK293-p740) і негативного контролю (SKBR-3). (B) Порівняння експресії CLDN18.2 між лізатами нетрансдукованих вихідних клітин і лізатами трансдукованих лентивірусом (LVT) клітинних ліній. Як позитивний й негативний контроль, відповідно, додавали клітини Patu8988S і SKBR-3.

Фіг. 14. Виявлення й клітинна локалізація експресії CLDN18 у клітинах ракових ліній підшлункової залози. Фарбування клітин ракових ліній підшлункової залози, вирощених на покривних скельцях. Антитіло: 35-22A (збільшення  $\times 20$ , час експозиції зазначений під кожним знімком). Для фарбування ядер використовували DAPI (сині). A: AsPC1; B: BxPC3; C: CFPAC; D: DANG; E: HPAF-II; F: HUP-T3; G: HUP-T4; H: KCI-M3; I: Panc1; J: Panc05.04; K: Panc02.04; L: Panc04.03; M: Patu8902; N: Patu8988S; O: Su86.86; P: Suit-2; Q: SW-1990; R: YAPC; S: контрольна лінія ракових клітин шлунка KATO-III.

Фіг. 15. Виявлення й клітинна локалізація експресії CLDN18 у трансдукованих CLDN18.2 клітинах ракових ліній підшлункової залози. Детектування CLDN18 у трансдукованих лентивірусом (LVT) клітинах ракових ліній підшлункової залози за допомогою антитіла 35-22A після фіксації й пермеабілізації. Для детектування використовували мічені Alexa488 або Alexa555 вторинні антитіла. A: BxPC3-LVT; B: CAPAN1-LVT; C: DANG-LVT; D: HPAC-LVT; E: MiaPaCa2-LVT; F: Patu8902-LVT; G: Suit-2-CKO; H: YAPC-LVT.

Фіг. 16. Зв'язування IMAB362 із клітинною поверхнею CLDN18.2-позитивних ліній клітин СА підшлункової залози (фармакодинаміка). IF-аналіз клітин ракових ліній підшлункової залози (A, B, D, E), трансдукованих лентивірусом клітинних ліній підшлункової залози (GL) і контрольних ракових клітин шлунка KATO-III (C, F), які експресують CLDN18.2. Клітини фарбували IMAB362 за нативних умов (D-E), а для порівняння - 35-22A після фіксації й пермеабілізації клітин (A-C). Для фарбування ядер використовували DAPI. Час експозиції зазначений на кожній панелі. G: BxPC3-LVT; H: CAPAN1-LVT; I: DANG-LVT; J: MiaPaCa2-LVT; K: Patu8902-LVT; L: Suit2-LVT.

Фіг. 17. Експресія CLDN18.2 у привитих пухлинах з різних клітинних ліній. Експресія CLDN18.2 у привитих пухлинах CAPAN1-LVT (A, B), BxPC3-LVT (C, D), PATU8988S-LVT (E, F), MiaPaCa2-LVT (G, H), YAPC-LVT (J, K) і DANG-LVT (L, M). Проводили фарбування тканин за допомогою антитіла Zymed-MID. Збільшення об'єктива  $\times 10$  (A, C, E, G, J, L) і  $\times 20$  (B, D, F, H, K, M).

Фіг. 18. Перевірка приживання клітин ракових ліній Suit-2 і MiaPaCa2 підшлункової залози. Клітини вводили у хвостову вену мишей nude. Тварин забивали через 45 (A), 52 (B), 59 (C) днів після введення Suit-2 (A-C) або через 59 (D), 66 (E), 73 (F) днів після введення MiaPaCa2 (D-F). Легені препарували й фарбували за допомогою антитіл до МНС класу I (проти МНС I людини, клон EPR1394Y) для виявлення клітин людини в тканинах миші.

Фіг. 19. Аналіз приживання метастазів Patu8988S. Клітини Patu8988S вводили мишам Nu/Nu внутрішньовенно по  $1 \times 10^6$  або  $2 \times 10^6$  клітин і в різні моменти часу в мишей видаляли легені (A) і печінку (B), як зазначено під віссю x. Для обчислення % присутності ДНК людини в кожному препараті тканини будували стандартну криву, змішуючи ДНК людини й миші й роблячи 7 $\times$ 5-разових розведень, одержуючи від 100 % (1) до 0,0064 % (7) ДНК людини.

Фіг. 20. Аналіз методом ІНС метастазів Patu8988S у тканинах легенів миші. Мишам вводили у хвостову вену клітини Patu8988S, а через різні проміжки часу (A-D = 70 днів, E-H = 86 днів) їх забивали, виділяли тканини легенів і фарбували за допомогою антитіла до МНС-I (EPR1394Y) (A, B, E, F) у розведенні 1:1000 або проти клаудину 18 (Zymed-MID) (C, D, G, H) при 0,2 мкг/мл. Збільшення: A, C, E, G =  $\times 10$  і B, D, F, H =  $\times 20$ .

Фіг. 21. Опосередкований IMAB362 апоптоз оброблених гемцитабіном ракових клітин підшлункової залози. Апоптоз індукували зшиванням CLDN18.2 на клітинах BxPC3~CLDN18 через 48 годин. Клітини BxPC3~CLDN18 культивували в середовищі без або + 100 нг/мл гемцитабіну. Частка апоптозних клітин у фракції моноклеарних клітин зміщала. Аналогічний зсув спостерігався при інкубації пухлинних клітин з камптотецином.

Фіг. 22. Виразність IMAB 362-індукованої ADCC-активності на ракових клітинах підшлункової залози. (A) ADCC проводили з CLDN18.2-позитивними клітинами ракових ліній підшлункової залози, використовуючи РВМС від різних донорів. (B-F) ADCC проводили з LVT-лініями ракових клітин підшлункової залози, які ектопічно експресують CLDN18.2, і відповідними вихідними клітинами (G): точковий графік.

Фіг. 23. Виразність IMAB 362-індукованої CDC-активності на ракових клітинах підшлункової залози. (A) CDC проводили зі збіркою сироваткою здорової людини як джерела комплементу, IMAB362 і CLDN18.2-позитивними контрольними клітинами CDOK1-p740 підшлункової залози в 4-х незалежних експериментах. (B) CDC проводили з CLDN18.2-позитивними (Patu8988S, DANG, Panc05.04) і CLDN18.2-негативними (CAPAN1, Suit2, BxPC3, YAPC) лініями клітин підшлункової залози. (C) CDC проводили з лініями клітин, які ектопічно експресують LVT. (D) Точковий графік, який показує концентрації IMAB362, що викликають напівмаксимальний ступінь лізису ( $EC_{50}$ ) клітин ракових ліній підшлункової залози. (E) Максимальний ступінь знищення клітин, отриманий з IMAB362 на клітинах ракових ліній підшлункової залози.

Фіг. 24. Вплив обробки IMAB362 на підшкірні ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT. Пухлини-ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $1 \times 10^7$  клітин MiaPaCa2-LVT підшкірно в бік 15 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. На третій день після введення ракових клітин починали обробку по 200 мкг IMAB362 або контролів, відповідно. Обробку продовжували по 2 рази на тиждень, чергуючи в/о і в/в введення аж до забою тварин. (A) Вплив обробки IMAB362 на ріст пухлин. Розмір п/ш пухлин вимірювали 2 рази на тиждень (середнє + SEM). (B) Графіки виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки.

Фіг. 25. Обробка IMAB362 підшкірних ксенотрансплантатів BxPC3-LVT. Пухлини-ксенотрансплантати BxPC3-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $1 \times 10^7$  клітин BxPC3-LVT підшкірно в бік 15 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. На третій день після введення ракових клітин починали обробку по 200 мкг IMAB362 або контролів, відповідно. Обробку продовжували по 2 рази на тиждень, чергуючи в/о і в/в введення аж до вибою тварин. (A) Вплив обробки IMAB362 на ріст пухлин. Розмір п/ш пухлин вимірювали 2 рази на тиждень (середнє + SEM). (B) Графіки виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах з'являлись виразки.

Фіг. 26. Вплив обробки IMAB362 на ріст панкреатичних метастазів Suit2-LVT. По  $2 \times 10^6$  ракових клітин Suit2-LVT вводили внутрішньовенно у хвостову вену 12 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. На третій день після введення ракових клітин починали обробку по 200 мкг IMAB362, 200 мкг ізотипного контролю або рівним об'ємом PBS. Тварин забивали на 42-й день після трансплантації. (A) Аналіз методом кількісної ПЛР (середнє

з 2-4 реакцій на 1 зразок) для визначення процентного вмісту ДНК людини в зразках легенів у мишей. (В) Відсоток покритої клітинами людини поверхні легенів у мишей за даними планіметрії. Імуногістохімічне фарбування клітин людини на зрізах тканин за допомогою антитіла проти МНС класу I людини. \*  $p < 0,05$  (тест Kruskal-Wallis). Планки похибок: середнє  $\pm$  SD.

Фіг. 27. Аналіз методами кількісної ПЛР і ІНС метастазів Patu8988S у легенях. Мишам вводили по  $2 \times 10^6$  клітин Patu8988S на мишу. Через 65 днів тварин забивали. Світлі кружечки: мишей забивали через 63 дні. (А) Мишей обробляли по 2 рази на тиждень 200 мкг ІМАВ362 або контрольним фізрозчином. Кількість ДНК людини (нг) при визначенні методом кількісної ПЛР розраховували за значеннями Ct. (В) Повтор експерименту по к-ПЛР, як описано в А. При цьому процентний вміст ДНК людини в ДНК миші розраховували за значеннями Ct. (С) Мишей обробляли ІМАВ362 і контрольним антитілом того ж ізо типу (ритуксимаб). Процентний вміст ДНК людини в легенях мишей розраховували за значеннями Ct. У групи ІМАВ362 виявився один викид (світлий трикутник). Значимість приводиться як із включенням, так і з виключенням значень викиду. (D/E) Такий же експеримент, як і в С. При цьому площа метастазів визначали за допомогою програми Image J. На точкових графіках значимість інгібування ІМАВ362 представлена як із включенням (D), так і з виключенням (E) значення викиду. Значення  $p$ : непарний  $t$ -критерій. Планки похибок: середнє  $\pm$  SD.

Фіг. 28. Криві доза-відповідь для гемцитабіну. Клітини ракових ліній підшлункової залози проявляють дуже великі відмінності в чутливості до гемцитабіну. Клітинні лінії піддавали впливу різних концентрацій гемцитабіну протягом 4 днів і визначали інгібування проліферації за допомогою аналізу на життєздатність.

Фіг. 29. Криві доза-відповідь для оксаліплатину. Клітини ракових ліній підшлункової залози проявляють дуже суттєві відмінності щодо чутливості до оксаліплатину. Клітинні лінії піддавали впливу різних концентрацій оксаліплатину протягом 4 днів і визначали інгібування проліферації за допомогою аналізу на життєздатність.

Фіг. 30. Вплив обробки хіміотерапевтичними засобами на експресію CLDN18.2 (PHK). PHK у необроблених і попередньо оброблених Gem (1 нг/мл) або GemOx (Gem 1 нг/мл + Ox 10 нг/мл) клітин DANG (2 дні) (А) або Patu8988S (В) при обробці протягом 3 днів Gem (10 нг/мл або GemOx (Gem 10 нг/мл + Ox 100 нг/мл). PHK перетворювали на кДНК і визначали рівень транскриптів CLDN18.2 кількісним методом ПЛР у реальному часі. Результати представлені у відносних одиницях у порівнянні з рівнем транскрипта гена домашнього господарства HPRT.

Фіг. 31. Вплив хіміотерапії на рівень білка CLDN18.2 у клітинах карциноми підшлункової залози. Аналізу на експресію CLDN18.2 піддавали загальний білок із клітинних лізатів необроблених (med) і попередньо оброблених Gem (1 нг/мл) або GemOx (GEM 1 нг/мл + Ox 10 нг/мл) клітин DANG (А) або Patu8988S (В) при детектуванні за допомогою поліклональної антисироватки Zymed C-term. Для перевірки однакового нанесення білків використовували актин.

Фіг. 32. Аналіз методом FACS експресії CLDN18.2 на клітинній поверхні. Експресія CLDN18 (темна гістограма) при культивуванні Patu8988S у середовищі (ліворуч) і обробці Gem (праворуч) представлена у вигляді накладення на ізотипний контроль. Клітини Patu8988S обробляли гемцитабіном (10 нг/мл) протягом 3 днів.

Фіг. 33. Аналіз клітинного циклу в клітин DANG, оброблених або не оброблених гемцитабіном (GEM; 2 нг/мл) або гемцитабіном + оксаліплатином (GemOx; 1 нг/мл + 10 нг/мл) протягом двох днів. (А) Обробка гемцитабіном приводить до зупинки клітинного циклу клітин у фазі S. Площа кожного стовпчика розділена для того, щоб показати відсоток клітин у фазах G0/G1, S і G2. (В) Вестерн-блотинг показав позитивну регуляцію CLDN18 після обробки Gem.

Фіг. 34. Вплив гемцитабіну на клітинний цикл (А) і експресію CLDN18.2 (В, С) у клітинах Patu8988S. Клітини Patu8988S обробляли або не обробляли гемцитабіном (10 нг/мл) протягом 2 днів. (А) Площа кожного стовпчика розділена для того, щоб показати відсоток клітин у фазах G0/G1, S і G2. На графіку представлена щільність CLDN18.2 (по осі x) відносно кількості клітин (по осі y). (В) Експресія CLDN18.2 за відсутності обробки (пунктирна лінія) у порівнянні з обробкою Gem (суцільна лінія). (С) Експресія CLDN18.2 в оброблених Gem клітинах Patu8988S у фазі G0/G1 (пунктирна лінія) у порівнянні із клітинами у фазі S (суцільна лінія).

Фіг. 35. Вплив хіміотерапії на ракові клітини шлунка. Культивування клітин KATO-III протягом 96 год. приводить до зупинки клітинного циклу у фазі G0/G1 (а) і негативної регуляції CLDN18.2 (с). Цитостатичні сполуки, що викликають зупинку клітинного циклу в різних фазах клітинного циклу, стабілізують експресію CLDN18.2 (с).

Фіг. 36. Вплив хіміотерапії на ракові клітини шлунка. Цитостатичні сполуки, які викликають зупинку клітинного циклу в різних фазах клітинного циклу: фазі S/G2 (іринотекан) або фазі G2

(доцетаксель). Площа кожного стовпчика розділена для того, щоб показати відсоток клітин у фазах G0/G1, S і G2.

Фіг. 37. Криві доза-відповідь для опосередкованої IMAB362 ADCC після хіміотерапевтичної обробки клітин DANG. (А) Криві доза-відповідь в одного репрезентативного донора після попередньої обробки ракових клітин DANG підшлункової залози за допомогою Gem або GemOx протягом 40 год. (В) Значення EC<sub>50</sub> (середні) для опосередкованої IMAB362 ADCC. Значення p: непарний t-критерій.

Фіг. 38. Вплив хіміотерапії на ракові клітини шлунка. а: Клітини, оброблені іринотеканом, доцетакселем або цисплатином, проявляють більш низький рівень життєздатних клітин у порівнянні з культивованими в середовищі клітинами мішені. c/d: Експресія CLDN18.2 у клітинах, оброблених іринотеканом, доцетакселем або цисплатином, підвищувалася в порівнянні із клітинами, культивованими в середовищі. c/d: Обробка клітин іринотеканом, доцетакселем або цисплатином посилює здатність IMAB362 індукувати ADCC.

Фіг. 39. Вплив хіміотерапевтичних засобів на опосередковану IMAB362 CDC у клітин MiaPaCa2-LVT. Криві доза-відповідь за 2 незалежними дослідженнями. MiaPaCa2-LVT культивували або в середовищі з Gem (10 нг/мл) або в середовищі з GemOx (10 нг/мл Gem + 100 нг/мл Ox) протягом 70 год.

Фіг. 40. Вплив хіміотерапії на індуковану IMAB362 CDC.

Фіг. 41. Вплив обробки IMAB362 у комбінації з Gem або GemOx на ксенотрансплантати VxPC3-LVT. Пухлини-ксенотрансплантати VxPC3-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $8,5 \times 10^6$  клітин VxPC3-LVT підшкірно в бік 10 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. На третій день після введення ракових клітин починали застосування хіміотерапії (50 мг/кг гемцитабіну в/о або 50 мг/кг гемцитабіну плюс 5 мг/кг оксаліплатину в/о, відповідно) і продовжували її раз на тиждень протягом 6 тижнів. Через 24 год. після введення хіміотерапевтичних засобів вводили внутрішньовенно у хвостову вену 800 мкг IMAB362 або контролю. Обробку IMAB362 продовжували раз на тиждень аж до забивання мишей. (А) Криві росту підшкірних ксенотрансплантатів VxPC3-LVT. Розмір п/ш пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM). (В) Криві виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки.

Фіг. 42. Підвищення протипухлинної ефективності при комбінуванні гемцитабіну з IMAB362. Пухлини-ксенотрансплантати VxPC3-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $8,5 \times 10^6$  клітин VxPC3-LVT підшкірно в бік 10 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. На третій день після введення ракових клітин починали застосування хіміотерапії (100 мг/кг гемцитабіну в/о або 100 мг/кг гемцитабіну плюс 5 мг/кг оксаліплатину в/о, відповідно) і продовжували її раз на тиждень протягом 6 тижнів. Через 24 год. після введення хіміотерапевтичних засобів вводили внутрішньовенно у хвостову вену 200 мкг (1/2 дози) або 400 мкг (повна доза) IMAB362. Обробку IMAB362 продовжували по 2 рази на тиждень, чергуючи в/о і в/в введення аж до забивання мишей. (А) Криві росту підшкірних ксенотрансплантатів VxPC3-LVT. Розмір п/ш пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM). (В) Криві виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки.

Фіг. 43. Вплив обробки IMAB362 у комбінації з гемцитабіном на ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT. Пухлини-ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $5 \times 10^6$  клітин MiaPaCa2-LVT підшкірно в бік 10 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. Через 4 дня після введення ракових клітин починали застосування хіміотерапії (50 мг/кг гемцитабіну в/о) і продовжували її раз на тиждень протягом 6 тижнів. Через 24 год. після введення хіміотерапевтичних засобів вводили внутрішньовенно у хвостову вену 200 мкг IMAB362 або контролю. Обробку IMAB362 продовжували по 2 рази на тиждень, чергуючи в/о і в/в введення аж до забивання мишей. (А) Ріст підшкірних ксенотрансплантатів. Розмір пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM). (В) Криві виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки.

Фіг. 44. Вплив обробки IMAB362 у комбінації з гемцитабіном на привиті пухлини-ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT. Пухлини-ксенотрансплантати MiaPaCa2-LVT прищеплювали шляхом ін'єкції  $1 \times 10^7$  клітин MiaPaCa2-LVT підшкірно в бік самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup>. Через 9 днів після підшкірної інюкуляції мишей, які мали пухлини, розбивали на однорідні групи обробки по 8 тварин у групі й починали обробку. Мишам вводили 150 мг/кг гемцитабіну в/о по 2 рази на тиждень протягом 4 тижнів. Через 24 год. після введення гемцитабіну вводили внутрішньовенно у хвостову вену 200 мкг IMAB362 або контролю. Обробку IMAB362 продовжували по 2 рази на тиждень, чергуючи в/о і в/в введення аж до забивання

мишей. (А) Розмір підшкірних пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM; \*\* =  $p < 0,01$ ). (В) Криві виживання Kaplan-Meier. Мишей забивали, коли об'єм пухлин досягав 1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки (лог-ранговий критерій Mantel-Cox; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Фіг. 45. Вплив IMAV362 у комбінації з гемцитабіном на метастази в легенях на моделі ксенотрансплантації Patu8988S. Уводили внутрішньовенно  $2 \times 10^6$  ракових клітин Patu8988S у хвостову вену 12 самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> на кожну групу обробки. Через 2 тижні після внутрішньовенного введення ракових клітин починали обробку 200 мкг IMAV362 по 2 рази на тиждень (чергуючи в/в - в/о) у комбінації із введенням 100 мг/кг гемцитабіну в/о по 2 рази на тиждень протягом 4 тижнів. Контрольна група одержувала по 200 мкг контрольного антитіла того ж ізотипа в комбінації з 100 мг/кг гемцитабіну по 2 рази на тиждень. Тварин забивали на 70-й день після трансплантації. (А) Кількісне визначення методом ПЛР (середнє з 3 реакцій на 1 зразок) ДНК людини в зразках легень в, що одержували IMAV362 та ізотипне антитіло мишей. (В) Відсоток покритої клітинами людини поверхні легень у мишей визначали на основі комп'ютерного аналізу. Проводили імуногістохімічне фарбування за допомогою антитіла проти МНС-I людини (клон EPR1394Y) залитих у парафіні тканинах легень (середнє  $\pm$  SEM;  $p = 0,0003$ , критерій Mann-Whitney). С і D: Приклади імуногістохімічного фарбування за допомогою антитіла проти МНС-I людини метастазів Patu8988S у легенях у мишей, які одержували IMAV362 + гемцитабін (С) або ізотипне антитіло + гемцитабін (D).

Розкриття сутності винаходу

Незважаючи на те, що даний винахід докладно описаний нижче, слід мати на увазі, що він не обмежується конкретними методами, методиками й реагентами, описаними тут, оскільки вони можуть варіюватися. Також слід мати на увазі, що термінологія, яка тут використовується, служить тільки для опису конкретних втілень і не повинна обмежувати об'єм даного винаходу, який обмежується лише прикладеною формулою винаходу. Якщо не зазначено іншого, усі технічні й наукові терміни, які тут використовуються, мають такі значення, які широко відомі пересічним фахівцям у даній галузі.

Далі будуть описані всі елементи даного винаходу. Ці елементи приводяться разом з конкретними втіленнями, однак слід мати на увазі, що їх можна комбінувати будь-яким способом і в будь-якій кількості для створення додаткових втілень. Наведені приклади й кращі втілення не повинні розглядатися як такі, що обмежують даний винахід тільки явно описаними втіленнями. Такий опис слід розуміти як такий, що підтримує та охоплює такі втілення, у яких явно описані втілення комбінуються з будь-якою кількістю наведених і/або кращих елементів. Більше того, будь-які перестановки й комбінації всіх описаних елементів у даній заявці слід розглядати як такі, що розкриваються описом даної заявки, якщо з контексту не випливає іншого.

Переважно терміни, які тут використовуються, визначаються так, як 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).

При практичному застосуванні даного винаходу повинні застосовуватися, якщо не зазначено іншого, стандартні методи хімії, біохімії, клітинної біології, імунології й технології рекомбінантної ДНК, які описані в літературі у даній галузі (наприклад, див. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989).

По всьому описі й наведених далі формулі винаходу, якщо з контексту не випливає іншого, слово "включати" і такі його варіанти, як "включає" і "який включає", слід розуміти як такі, що означають включення зазначеного елемента, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій, але не виключення будь-якого іншого елемента, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій, хоча в якихось втіленнях такі елементи, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій можуть виключатися, тобто це питання полягає у включенні зазначеного елемента, числа або стадії або групи елементів, чисел або стадій. Форми однини при описі винаходу (особливо в контексті формули) слід розуміти як такі, що охоплюють і однину, і множину, якщо інакше не зазначене прямо або явно суперечить контексту. Вказування діапазонів значень тут усього лише служить коротким способом конкретного переліку всіх окремих значень, які охоплюються цим діапазоном. Якщо не зазначено інакшого, кожне окреме значення включається до опису так, ніби воно було вказане окремо. Усі описані тут методи можуть виконуватися в будь-якому придатному порядку, якщо не зазначено інакшого або ж це явно суперечить контексту. Використання яких б то не було прикладів або типових виразів (наприклад, "такий як"), наведених тут, служить тільки лиш для кращого розкриття винаходу й не обмежує обсягу винаходу, заявленого у формулі. Ніякі вирази в описі не слід розуміти як такі, що указують на який-небудь незаявлений елемент, необхідний для практичного застосування

винаходу.

У тексті даного опису приводяться деякі документи. Кожний з наведених тут документів (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, специфікації виробника, інструкції тощо), будь-то вище або нижче, тим самим включаються тут у всій повноті як посилання. При цьому ніщо не повинне тлумачитися як допущення того, що винахід не може передбачати такого опису через винаходи, які йому передують.

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

Термін "CLDN18.2" переважно відноситься до CLDN18.2 людини, зокрема, до білка, який містить, бажано складається з амінокислотної послідовності за SEQ ID NO: 1 з переліку послідовностей або варіанта даної амінокислотної послідовності.

Термін "CLDN18.1" переважно відноситься до CLDN18.1 людини, зокрема, до білка, який містить, бажано складається з амінокислотної послідовності за SEQ ID NO: 2 з переліку послідовностей або варіанта даної амінокислотної послідовності.

Термін "варіант" відповідно до винаходу відноситься, зокрема, до мутантів, сплайс-варіантів, конформацій, ізоформ, алельних варіантів, видових варіантів і видових гомологів, зокрема тих, які зустрічаються в природі. Алельний варіант означає таку зміну в нормальній послідовності гена, значення якої найчастіше є неясним. При повному секвенуванні гена часто ідентифікуються численні алельні варіанти даного гена. Видовий гомолог позначає те, що джерелом походження нуклеотидної або амінокислотної послідовності є інший вид, ніж у даної нуклеотидної або амінокислотної послідовності. Термін "варіант" також охоплює будь-які варіанти, які зазнали посттрансляційної модифікації й конформаційні варіанти.

Відповідно до винаходу, термін "CLDN18.2-позитивний рак" означає рак за участю ракових клітин, які експресують CLDN18.2, бажано на поверхні даних ракових клітин.

Вираз "клітинна поверхня" використовується відповідно до свого звичайного значення у даній галузі, так що він позначає зовнішню поверхню клітини, яка доступна для зв'язування з білками й іншими молекулами. Наприклад, трансмембранний білок, який має одну або кілька позаклітинних ділянок, вважається таким, що експресується на клітинній поверхні.

CLDN18.2 експресується на клітинній поверхні, якщо він розташовується на поверхні даних клітин і доступний для зв'язування з CLDN18.2-специфічними антитілами при додаванні їх до клітин.

Відповідно до винаходу, CLDN18.2 практично не експресується в клітинах, якщо його рівень експресії нижче в порівнянні з експресією в клітинах шлунка або тканині шлунка. Бажано рівень експресії становить менше 10 %, бажано менше 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05 % від рівня експресії в клітинах шлунка або тканині шлунка або ще нижче. Бажано CLDN18.2 практично не експресується в клітинах, якщо його рівень експресії перевищує рівень експресії в іншій нераковій тканині, крім шлунка, не більше ніж в 2 рази, бажано в 1,5 рази, а краще не перевищує рівня експресії в даній нераковій тканині. Бажано CLDN18.2 практично не експресується в клітинах, якщо його рівень експресії нижче від межі виявлення й/або якщо рівень експресії буде занадто низьким для зв'язування CLDN18.2-специфічних антитіл при додаванні їх до клітин.

Відповідно до винаходу, CLDN18.2 експресується в клітинах, якщо його рівень експресії перевищує рівень експресії в іншій нераковій тканині, крім шлунка, переважно більше ніж в 2 рази, бажано в 10 разів, 100 разів, 1000 разів або 10000 разів. Бажано CLDN18.2 експресується в клітинах, якщо його рівень експресії вище від межі виявлення й/або якщо рівень експресії буде достатньо високим для зв'язування CLDN18.2-специфічних антитіл при додаванні їх до клітин. Бажано при експресуванні CLDN18.2 у клітинах він експресується або виступає на поверхні даних клітин.

Відповідно до винаходу термін "захворювання" позначає будь-який патологічний стан, у тому числі рак, зокрема форми рака, описані тут. Будь-які згадування раку або певних форм раку також включають і їх метастази. У кращому втіленні в захворюванні, що підлягає лікуванню відповідно до даної заявки, беруть участь клітини, які експресують CLDN18.2.

"Захворювання, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2" або аналогічні вирази означають відповідно до винаходу, що в клітинах уражених тканин або органів експресується CLDN18.2. В одному втіленні експресія CLDN18.2 у клітинах уражених тканин або органів зростає в порівнянні зі здоровою тканиною або органом. Зростання означає підвищення щонайменше на 10 %, зокрема, щонайменше на 20 %, на 50 %, на 100 %, на 200 %, на 500 %, на 1000 %, на 10000 % або ще більше. В одному втіленні експресія відбувається тільки в ураженій тканині, тоді як у відповідній здоровій тканині експресія пригнічується. Наприклад,



CLDN18.2 експресується в раковій тканині підшлункової залози, але він не виявляється в нераковій тканині підшлункової залози. Відповідно до винаходу, захворювання, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2, включають ракові захворювання. Крім того, відповідно до винаходу, ракові захворювання переважно представлені тими, при яких у ракових клітинах експресується CLDN18.2.

У даному винаході "ракове захворювання" або "рак" включає такі захворювання, які характеризуються аномальною регуляцією росту, проліферації, диференціювання, адгезії й/або міграції клітин. Під "раковими клітинами" розуміють аномальні клітини, які ростуть у процесі швидкої, неконтрольованої проліферації клітин і продовжують рости після припинення тих стимулів, які викликали ріст новоутворення. Бажано "ракове захворювання" характеризується наявністю клітин, які експресують CLDN18.2, причому ракові клітини експресують CLDN18.2. Клітини, які експресують CLDN18.2, бажано є раковими клітинами, бажано описаних тут видів раку.

Відповідно до винаходу, "карцинома" означає злоякісну пухлину, яка походить з епітеліальних клітин.

"Аденокарцинома" означає такий рак, який виникає в залозистій тканині. Такі тканини також входять до більшої категорії тканин, відомих як епітеліальні тканини. Епітеліальні тканини включають шкіру, залози й цілий ряд інших тканин, що вистилають порожнини й органи тіла. Ембріологічно епітелій походить із ектодерми, ендодерми й мезодерми. Для класифікування як аденокарциноми клітини не обов'язково повинні бути частиною залози, якщо лише вони мають секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати в деяких вищих ссавців, включаючи людину. Добре диференційована аденокарцинома звичайно подібна до тієї залозистої тканини, з якої вона походить, тоді як погано диференційована може й не мати подібності. За фарбуванням клітин з біопсії патологоанатом повинен визначити, чи є пухлина аденокарциномою або належить до якогось іншого типу раку. Аденокарцинома може виникати в багатьох тканинах організму внаслідок повсюдної наявності залоз в організмі. Хоча не кожна залоза може секретувати ту саме речовину, однак, якщо клітини виконують екзокринні функції, то вони вважаються залозистими, а їх злоякісні форми при цьому називаються аденокарциномами. Злоякісні аденокарциноми проникають в інші тканини й найчастіше дають метастази, якщо в них буде досить часу для цього.

Підшлункова залоза - орган ендодермального походження, вона є ключовим регулятором розщеплення білків і вуглеводів і гомеостазу глюкози. Екзокринна частина підшлункової залози (80 % від маси всього органа) складається з розгалуженої мережі ацинарних клітин і клітин протоків, які виробляють і доставляють травні ферменти в шлунково-кишковий тракт. Ацинарні клітини, які утворюють функціональні одиниці уздовж мережі протоків, синтезують і секретують ферменти в просвіт протоків у відповідь на сигнали зі шлунка й дванадцятипалої кишки. В ацинарних ланках поблизу протоків перебувають центроацинарні клітини. Ендокринна частина підшлункової залози, яка регулює метаболізм і гомеостаз глюкози за допомогою виділення гормонів у кров, складається із чотирьох спеціалізованих типів ендокринних клітин, зібраних у кластери, які називаються острівцями Лангерганса.

Рак підшлункової залози є злоякісним новоутворенням, яке походить із трансформованих клітин, які виникають у тканинах, що складають підшлункову залозу. Рак підшлункової залози посідає четверте місце за смертністю від раку в США, а в усьому світі - восьме. Спочатку рак підшлункової залози найчастіше не викликає симптомів, а більш пізні симптоми, як правило, неспецифічні й різноманітні. Тому рак підшлункової залози часто не виявляється аж до пізніх стадій. Рак підшлункової залози має поганий прогноз: на всіх стадіях разом коефіцієнт виживання до 1 року і до 5 років становить 25 % і 6 %, відповідно. При локалізованому захворюванні виживання до 5 років становить приблизно 20 %, тоді як середнє виживання при локалізованому запущеному й при метастатичному захворюванні, які в сукупності складають більше 80 % хворих, - близько 10 і 6 місяців, відповідно.

Рак підшлункової залози включає аденокарциноми (пухлини, що проявляють залозисту архітектуру), що виникають в екзокринній частині підшлункової залози, і нейроендокринні карциноми, що виникають із острівкових клітин.

Найпоширеніша форма раку підшлункової залози - аденокарцинома протоків, як правило, характеризується помірно або слабо диференційованими залозистими структурами при мікроскопічному дослідженні. Аденокарцинома протоків підшлункової залози (PDAC) звичайно виникає в голівці підшлункової залози з інфільтрацією в навколишні тканини, у тому числі лімфатичні вузли, селезінку й черевну порожнину, а також з метастазами в печінці й легенях. PDAC головним чином проявляє залозистий профіль із протокоподібними структурами й різним ступенем атипії й диференціювання клітин. Менше поширені підтипи PDAC включають колоїдну,

залозисто-плоскоклітинну або саркоматоїдну гістологію. Найчастіше в окремій пухлині існують регіональні відмінності гістології, ступеню злоякісності й ступеню диференціювання. Навіть дрібні первинні ураження звичайно проявляють периневральне й лімфо-судинне інвазіювання, що свідчить про схильність до раннього й далекого поширення.

5 Другим за поширеністю типом рака екзокринної підшлункової залози є слизуватий. Слизувата аденокарцинома виробляє великий об'єм муцину, що призводить до кистозного виду при томографії.

Нейроендокринні пухлини підшлункової залози утворюються з клітин, які виробляють гормони (острівкових клітин) підшлункової залози. Ацинозно-клітинні новоутворення виникають із ацинарних клітин підшлункової залози.

Відповідно до винаходу, термін "рак" також включає метастази раку з первинних пухлин типу первинного раку підшлункової залози. Так, якщо, наприклад, згадується рак підшлункової залози, то це також включає метастази раку підшлункової залози, наприклад, метастази в легені, печінку й/або лімфатичні вузли.

15 Під "утворенням метастаз" розуміють поширення ракових клітин зі свого вихідного місця в інші частини тіла. Утворення метастаз є дуже складним процесом і залежить від відділення злоякісних клітин з первинної пухлини, інвазії в позаклітинний матрикс, проникнення через базальні мембрани ендотелію для потрапляння в порожнину тіла й судини, а потім, після перенесення із кров'ю, інфільтрації в органи-мішені. Нарешті, ріст нових пухлин на місці мішені залежить від ангиогенеза. Утворення метастаз пухлин часто відбувається навіть після видалення первинної пухлини, оскільки пухлинні клітини або їх компоненти можуть залишатися й створювати метастатичний потенціал. В одному втіленні термін "утворення метастаз" 20 відповідно до винаходу відноситься до "віддалених метастазів", що означає метастази, віддалені від первинної пухлини й регіональної системи лімфатичних вузлів. В одному втіленні термін "метастази", відповідно до винаходу, відноситься до метастаз у лімфатичних вузлах. Один конкретний вид метастазів, який можна лікувати за допомогою терапії по винаходу, 25 представлений метастазами, які походять з раку підшлункової залози як первинного сайту. У кращих втіленнях такі метастази рака підшлункової залози представлені метастазами в лімфатичних вузлах, метастазами в легенях й/або метастазами в печінці.

30 Пухлина Крукенберга - метастатична пухлина яєчників, яка рідко зустрічається і яка складає від 1 % до 2 % усіх пухлин яєчників. Пухлина Крукенберга є метастатичною аденокарциномою перснеподібних клітин яєчників. У більшості випадків пухлин Крукенберга (70 %) первинною ділянкою є шлунок. Наступними за поширеністю первинними ділянками є карциноми товстої кишки, апендикса й молочної залози (в основному інвазивна долькова карцинома). Відзначені 35 рідкі випадки пухлин Крукенберга, які походять з карциноми жовчного міхура, жовчовивідних шляхів, підшлункової залози, тонкої кишки, фатової ампули, шийки матки й сечового міхура/сечової протоки.

Рефрактерним є таке ракове захворювання, для якого певне лікування не є ефективним, причому воно або початково не піддається лікуванню, або перестає піддаватися лікуванню 40 згодом.

Під "лікуванням" розуміють введення суб'єктові сполуки або композиції або комбінації сполук або композицій для запобігання або усунення захворювання, включаючи зменшення розміру пухлини або кількості пухлин у суб'єкта; припинення або уповільнення хвороби в суб'єкта; 45 пригнічення або уповільнення розвитку нового захворювання в суб'єкта; зменшення частоти або тяжкості симптомів й/або рецидивів у суб'єкта, у якого зараз або раніше було захворювання; й/або продовження, тобто збільшення тривалості життя в суб'єкта.

Зокрема, термін "лікування захворювання" включає лікування, скорочення тривалості, ослаблення, запобігання, уповільнення або пригнічення розвитку або погіршення або запобігання або затримку виникнення захворювання або його симптомів.

50 Термін "пацієнт", відповідно до винаходу, позначає суб'єкта, який підлягає лікуванню, зокрема хворих суб'єктів, включаючи людей, приматів або інших тварин, особливо таких ссавців, як корови, коні, свині, вівці, кози, собаки, кішки або такі гризуни, як миші й пацюки. В найкращому втіленні пацієнтом є людина.

Термін "засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" відноситься до таких засобів або комбінацій засобів, надходження яких до клітин призводить до підвищення рівня РНК й/або білка CLDN18.2 у даних клітинах, бажано до підвищення рівня білка CLDN18.2 на 55 поверхні клітин у порівнянні із ситуацією, коли клітини не одержують цього засобу або комбінації засобів. Бажано клітини представлені раковими клітинами, зокрема раковими клітинами, які експресують CLDN18.2, тому вони є мішенню для антитіл, які зв'язують CLDN18.2, як то клітини описаних тут типів рака, зокрема, рака підшлункової залози. Термін "засіб, який стабілізує або 60

підвищує експресію CLDN18.2", зокрема, відноситься до таких засобів або комбінацій засобів, надходження яких до клітин призводить до підвищення щільності CLDN18.2 на поверхні даних клітин у порівнянні із ситуацією, коли клітини не одержують цього засобу або комбінації засобів. "Стабілізація експресії CLDN18.2", зокрема, включає ситуації, коли засіб або комбінація засобів запобігає зниженню або зменшує зниження експресії CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 буде знижуватися без застосування засобу або комбінації засобів, а застосування засобу або комбінації засобів запобігає такому зниженню або зменшує таке зниження експресії CLDN18.2. "Підвищення експресії CLDN18.2", зокрема, включає ситуації, коли засіб або комбінація засобів підвищує експресію CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 буде знижуватися, залишатися практично постійною або підвищуватися без застосування засобу або комбінації засобів, а застосування засобу або комбінації засобів підвищує експресію CLDN18.2 у порівнянні із ситуацією без застосування засобу або комбінації засобів, у результаті чого експресія буде вищою в порівнянні із ситуацією, коли експресія CLDN18.2 могла б знижуватися, залишатися практично постійною або підвищуватися без застосування засобу або комбінації засобів.

Відповідно до винаходу, термін "засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" включає хіміотерапевтичні засоби або комбінації таких хіміотерапевтичних засобів, як цитостатики. Хіміотерапевтичні засоби можуть впливати на клітини одним з наступних способів: (1) пошкоджувати ДНК у клітинах, так що вони більше не можуть відтворюватися, (2) інгібувати синтез нових ланцюжків ДНК, так що реплікація клітин стає неможливою, (3) зупиняти мітотичні процеси в клітинах, так що клітини не можуть ділитися на дві клітини.

Відповідно до винаходу, термін "засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" бажано відноситься до таких засобів або комбінацій засобів, як цитостатичні сполуки або комбінації цитостатичних сполук, надходження яких до клітин, зокрема раковим клітинам, призводить до того, що клітини зупиняються або накопичуються в одній або декількох фазах клітинного циклу, бажано в одній або декількох інших фазах клітинного циклу, ніж фази G1 і G0, бажано інших, ніж фаза G1, бажано в одній або декількох з фаз G2 або S клітинного циклу, як то фази G1/G2, S/G2, G2 або S клітинного циклу. Термін "клітини зупиняються або накопичуються в одній або декількох фазах клітинного циклу" означає те, що зростає відсоток клітин, які перебувають в одній або декількох фазах клітинного циклу. Кожна клітина в процесі свого відтворення проходить цикл, який складається із чотирьох фаз. Перша фаза називається G1, і в ній клітина готується до відтворення своїх хромосом. Другий етап називається S, і в цій фазі відбувається синтез ДНК і дуплікація ДНК. Наступна фаза - фаза G2, коли відбувається дуплікація РНК і білків. Заключна стадія - стадія М, яка полягає в реальному поділі клітин. На цій заключній стадії, ДНК і РНК, які пройшли дуплікацію, розділяються й рухаються до різних полюсів клітини, а клітина насправді ділиться на дві однакові функціональні клітини. Хіміотерапевтичні засоби, які викликають пошкодження ДНК, звичайно приводять до нагромадження клітин у фазі G1 і/або G2. Хіміотерапевтичні засоби, які блокують ріст клітин, перешкоджаючи синтезу ДНК, типу антиметаболітів, звичайно викликають нагромадження клітин у фазі S. Прикладами таких препаратів є гемцитабін, 6-меркаптопурин і 5-фторурацил.

Відповідно до винаходу, термін "засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" включає аналоги нуклеозидів, такі як гемцитабін, 5-фторурацил або їх форми проліків, сполуки платини, такі як цисплатин і оксалиплатин, таксани, такі як паклітаксель і доцетаксель, і аналоги камптотецину, такі як іринотекан і топотекан, і комбіновані препарати, як то комбіновані препарати, які включають один або кілька з поміж гемцитабіну, оксалиплатину й 5-фторурацилу, як то комбіновані препарати, які містять гемцитабін і оксалиплатин, гемцитабін і 5-фторурацил, оксалиплатин і 5-фторурацил або інші описані тут комбінації препаратів. Відповідно до винаходу, посилення на засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2, як то посилення на аналог нуклеозида, сполуки платини або аналог камптотецину або таксан, наприклад, посилення на гемцитабін, 5-фторурацил, оксалиплатин, іринотекан або паклітаксель, повинні включати і їх форми проліків, такі як складні ефіри, солі або похідні типу кон'югатів даних засобів. Прикладами їх є кон'югати даних засобів з речовинами-носіями, наприклад, пов'язаний з білком паклітаксель типу пов'язаного з альбуміном паклітакселею. Бажано солі даних засобів є фармацевтично прийнятними.

В одному кращому втіленні "засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" є або містить "засіб, який індукує імунногенну загибель клітин".

За певних обставин ракові клітини можуть вступати на летальний стресовий шлях, пов'язаний з подачею заданої в просторі й часі комбінації сигналів, яка декодується імунною системою для активації пухлиноспецифічних імунних відповідей (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798-804). За таким сценарієм ракові клітини активуються й подають сигнали, які сприймаються вродженими імунними ефекторами типу дендритних клітин і запускають когнатну імунну

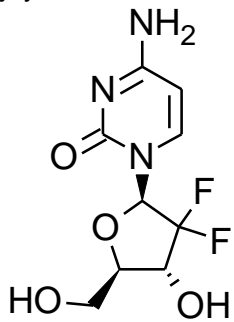
відповідь, яка включає Т-клітини CD8+ і сигналізацію IFN-γ для того, щоб загибель ракових клітин могла викликати продуктивну протиракову імунну відповідь. Ці сигнали включають преапоптотичний вплив на шаперон ендоплазматичного ретикулума (ER) - кальретикулін (CRT) на клітинній поверхні, преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1. У цілому ці процеси становлять молекулярні детермінанти імуногенної загибелі клітин (ICD). Антрацикліни, оксаліплатин, і γ-опромінення здатні індукувати усі сигнали, які визначають ICD, тоді як для цисплатину, наприклад, який не здатний індукувати транслокацію CRT з ER на поверхню клітин, що гинуть, тобто процес, що вимагає ER-стресу, необхідне сприяння тапсигаргіну, індуктора ER-стресу.

Відповідно до винаходу, термін “засіб, який індукує імуногенну загибель клітин” відноситься до таких засобів або комбінацій засобів, які при надходженні їх до клітин, зокрема ракових клітин, здатні індукувати вступ клітин на летальний стресовий шлях, який в остаточному підсумку викликає пухлиноспецифічні імунні відповіді. Зокрема, засоби, які індукують імуногенну загибель клітин, при надходженні їх до клітин викликають подачу клітинами заданої в просторі й часі комбінації сигналів, що включають, зокрема, преапоптотичний вплив на шаперон ендоплазматичного ретикулума (ER) - кальретикулін (CRT) на клітинній поверхні, преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1.

Відповідно до винаходу, термін “засіб, який індукує імуногенну загибель клітин”, охоплює антрацикліни й оксаліплатин.

Термін “аналог нуклеозида” відноситься до структурних аналогів нуклеозидів - категорії, яка включає й аналоги пуринів, і аналоги піримідинів.

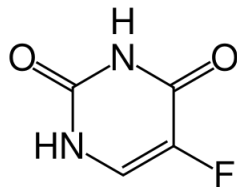
Термін “гемцитабін” позначає сполуку, яка є аналогом нуклеозида згідно наступної формули:



Зокрема, цей термін позначає сполуку 4-аміно-1-(2-дезоксид-2,2-дифтор-β-D-еритропентофуранозил)піримідин-2(1H)-он або 4-аміно-1-[(2R,4R,5R)-3,3-дифтор-4-гідрокси-5-(гідроксиметил)оксолан-2-іл]-1,2-дигідропіримідин-2-он.

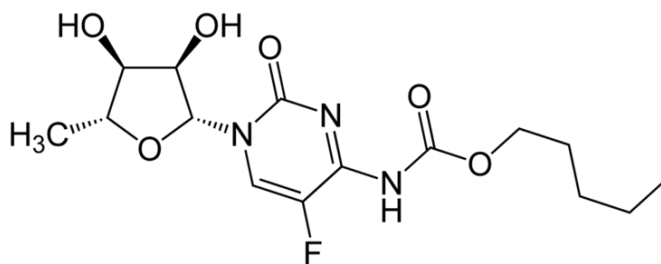
Відповідно до винаходу, гемцитабін переважно вводиться внутрішньовенно. Бажано гемцитабін уводиться в дозах від 0,5 до 2 г/м<sup>2</sup>, бажано від 0,8 до 1,5 г/м<sup>2</sup>, краще від 1 до 1,2 г/м<sup>2</sup> площі поверхні тіла. Наприклад, гемцитабін можна вводити в дозі 1000 мг на квадратний метр раз на тиждень протягом 7 із 8 тижнів, а потім раз на тиждень протягом 3 із 4 тижнів.

Термін “аналог нуклеозида” включає такі похідні фторпіримідинів, як фторурацил і його форми проліків. Термін “фторурацил” або “5-фторурацил” (5-FU або f5U) (у продажу під торговельними марками Adrucil, Carac, Efudix, Efudex і Fluoroplex) означає сполуку, яка є аналогом піримідину згідно наступної формули:



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

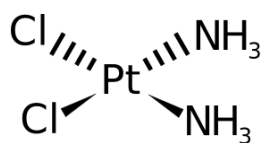
Термін “капецитабін” (Xeloda, Roche) відноситься до хіміотерапевтичного засобу, який є проліками, які в тканинах перетворюються на 5-FU. Капецитабін, який можна вводити перорально, має наступну формулу:



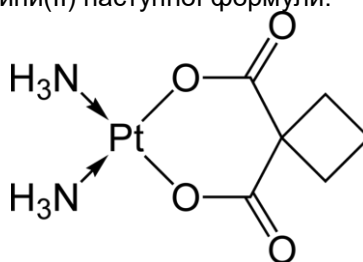
Зокрема, цей термін відноситься до сполуки пентил-[1-(3,4-дигідрокси-5-метилтетрагідрофуран-2-іл)-5-фтор-2-оксо-1Н-піримідин-4-іл]карбамат.

Відповідно до винаходу, термін "сполука платини" відноситься до сполук, які у своїй структурі містять платину, типу комплексів платини, і включає такі сполуки, як цисплатин, карбоплатин і оксаліплатин.

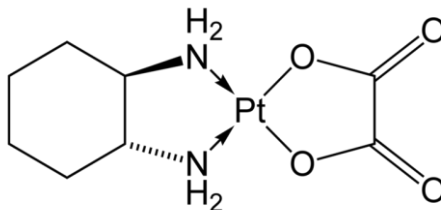
Термін "цисплатин" або "цисплатина" відноситься до сполуки цис-діамінхлорплатини(II) (CDDP) наступної формули:



10 Термін "карбоплатин" відноситься до сполуки цис-діамін-(1,1-циклобутандикарбоксилато)платини(II) наступної формули:



Термін "оксаліплатин" відноситься до сполуки, яка є сполукою платини, яка утворює комплекс із лігандом, який несе діаміноциклогексан згідно наступної формули:

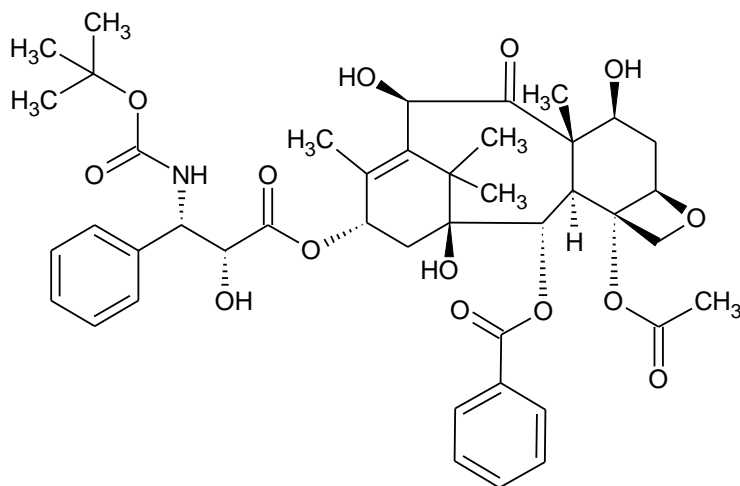


15 Зокрема, термін "оксаліплатин" відноситься до сполуки [(1R,2R)-циклогексан-1,2-діамін](етандіоато-О,О')платини(II). Оксаліплатин для ін'єкцій також надходить у продаж під торговельною назвою Eloxatine.

20 Таксани представляють клас дитерпенових сполук, які були вперше отримані з таких природних джерел, як рослини роду Taxus, але деякі були синтезовані штучно. Основним механізмом дії препаратів класу таксанів є порушення функції мікротрубочок, що інгібує процес поділу клітин. Таксани включають доцетаксель (Taxotere) і паклітаксель (Taxol).

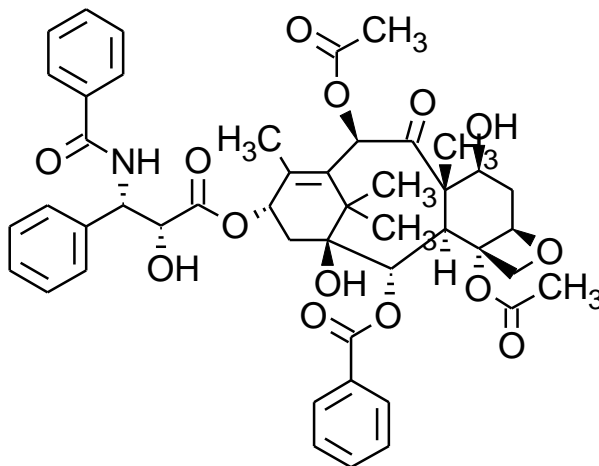
Відповідно до винаходу, термін "доцетаксель" відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:

25



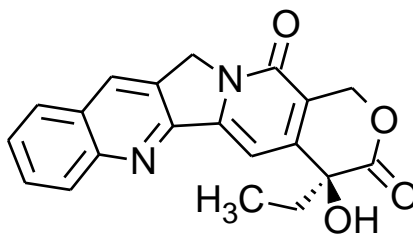
Зокрема, термін “доцетаксель” відноситься до сполуки 1,7β,10β-тригідрокси-9-оксо-5β,20-епокситакс-11-ен-2α,4,13α-триїл-4-ацетат-2-бензоат-13-((2R,3S)-3-[(трет-  
5 бутоксикарбоніл)аміно]-2-гідрокси-3-фенілпропаноат}.

Відповідно до винаходу, термін “паклітаксель” відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:



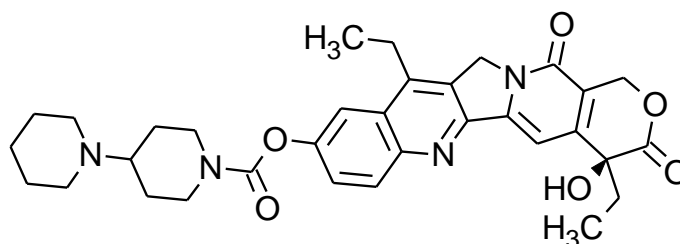
Зокрема, термін “паклітаксель” відноситься до сполуки (2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-біс-  
10 (ацетилокси)-13-[[[(2R,3S)-3-(бензоїламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси]-1,7-дигідрокси-9-оксо-5,20-епокситакс-11-ен-2-іл-бензоат.

Відповідно до винаходу, термін “аналог камптотецину” відноситься до похідних сполуки камптотецину (CPT; (S)-4-етил-4-гідрокси-1Н-пірано[3',4':6,7]індолізино-[1,2-b] хінолін-3,14-(4Н,12Н)-діон). Бажано термін “аналог камптотецину” відноситься до сполук, які містять  
15 наступну структуру:



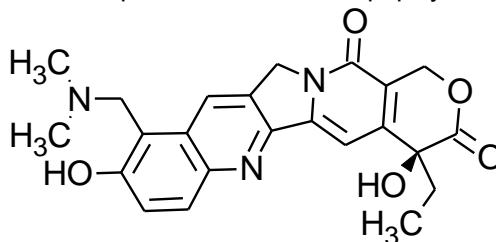
Відповідно до винаходу, кращими аналогами камптотецину є інгібітори ферменту ДНК-топоізомерази I (торо I). Кращими аналогами камптотецину відповідно до винаходу є іринотекан і топотекан.

Іринотекан - препарат, який перешкоджає розкручуванню ДНК шляхом інгібування  
20 топоізомерази I. З хімічної точки зору, він є напівсинтетичним аналогом природного алкалоїду камптотецину, який має наступну формулу:



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

5      Топотекан є інгібітором топоізомерази відповідно до формули:



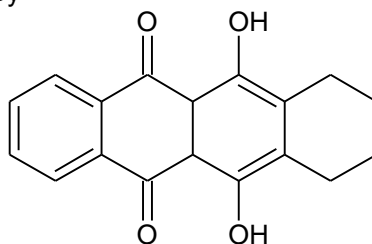
Зокрема, термін “топотекан” відноситься до сполуки (S)-10-[(диметиламіно)метил]-4-етил-4,9-дигідрокси-1H-пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-3,14(4H,12H)-діон моногідрохлорид.

10      Антрацикліни представляють клас лікарських препаратів, які широко застосовуються при хіміотерапії раку, а також є антибіотиками. За структурою всі антрацикліни містять загальну 4-кільцеву структуру 7,8,9,10-тетрагідротетрацен-5,12-хінону й зазвичай вимагають глікозилування за певними сайтами.

15      Антрацикліни переважно діють за одним або кількома з поміж наступних механізмів дії: 1) інгібування синтезу ДНК і РНК шляхом інтеркаляції між парами основ у нитці ДНК/РНК, тим самим запобігаючи реплікації швидкозростаючих ракових клітин; 2) інгібування ферменту топоізомерази II, що запобігає розкручуванню суперспіральної ДНК і тим самим блокує транскрипцію й реплікацію ДНК; 3) опосередкована залізом генерація вільних радикалів кисню, які пошкоджують ДНК і клітинні мембрани.

20      Відповідно до винаходу, термін “антрациклін” переважно відноситься до таких засобів, бажано протиракових засобів, які індукують апоптоз, бажано шляхом інгібування розкручування ДНК топоізомеразою II.

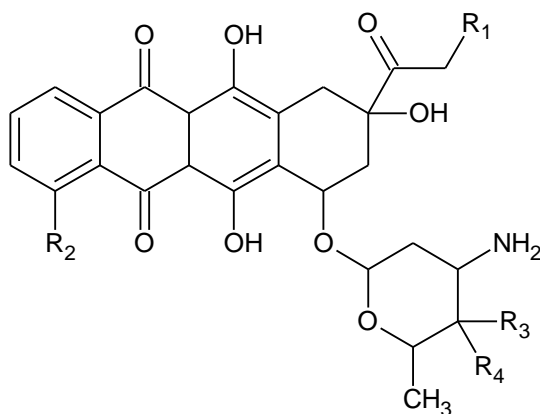
Бажано, згідно з винаходом, термін “антрациклін” взагалі відноситься до класу сполук, які мають наступну кільцеву структуру



25      включаючи їх аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, ефіри, кон'югати й форми проліків.

30      Приклади антрациклінів і аналогів антрациклінів включають, без обмеження, даунорубіцин (дауноміцин), доксорубіцин (адриаміцин), епірубіцин, ідарубіцин, родоміцин, пірарубіцин, вальрубіцин, N-трифтор-ацетил-доксорубіцин-14-валерат, аклациноміцин, морфолінодоксорубіцин (морфоліно-DOX), ціаноморфолінодоксорубіцин (ціаноморфоліно-DOX), 2-піролінодоксорубіцин (2-PDOX), 5-імінодауноміцин, мітоксантрон і аклациноміцин (акларубіцин). Мітоксантрон є представником класу сполук антрацендіонів, які є аналогами антрацикліну, що не містять сахаридної частини антрациклінів, але зберігають планарну структуру поліциклічного ароматичного кільця, яка дозволяє інтеркаляцію в ДНК.

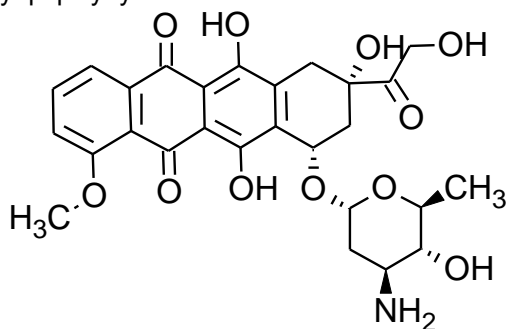
35      Кращими антрациклінами запропонованими винаходом є сполуки наступної формули:



де: R<sub>1</sub> обраний із групи, яка складається з Н і ОН, R<sub>2</sub> - із групи, яка складається з Н і ОМе, R<sub>3</sub> - із групи, яка складається з Н і ОН, а R<sub>4</sub> - із групи, яка складається з Н і ОН.

В одному втіленні R<sub>1</sub> означає Н, R<sub>2</sub> - ОМе, R<sub>3</sub> - Н, а R<sub>4</sub> - ОН. В іншому втіленні R<sub>1</sub> означає ОН, R<sub>2</sub> - ОМе, R<sub>3</sub> - Н, а R<sub>4</sub> - ОН. В іншому втіленні R<sub>1</sub> означає ОН, R<sub>2</sub> - ОМе, R<sub>3</sub> - ОН, а R<sub>4</sub> - Н. В іншому втіленні R<sub>1</sub> означає Н, R<sub>2</sub> - Н, R<sub>3</sub> - Н, а R<sub>4</sub> - ОН.

Особливо кращим антрацикліном у даному винаході є епірубіцин - антрацикліновий препарат, який має наступну формулу:



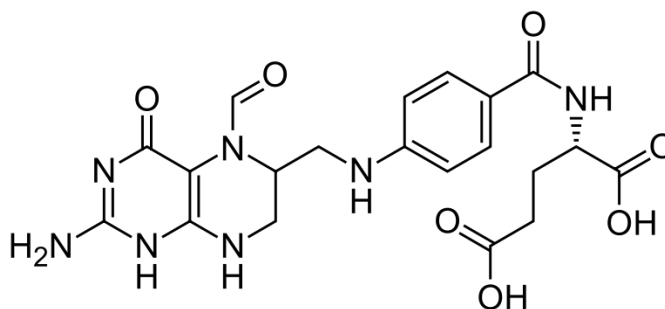
і надходить у продаж під торговельною маркою Ellence у США й Pharmorubicin або Epirubicin Ebewe в інших країнах. Зокрема, термін "епірубіцин" відноситься до сполуки (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-аміно-5-гідрокси-6-метил-оксан-2-іл]окси-6,11-дигідрокси-8-(2-гідроксиацетил)-1-метокси-8-метил-9,10-дигідро-7H-тетрацен-5,12-діон. Епірубіцин у деяких схемах хіміотерапії кращий від доксорубіцину, найбільш популярного антрацикліну, оскільки він спричиняє менше побічних ефектів.

Відповідно до винаходу, засіб, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2, може бути хіміотерапевтичним засобом, зокрема, хіміотерапевтичним засобом, призначеним для лікування раку, який може входити в комбінації препаратів типу комбінацій препаратів, призначених для застосування при лікуванні раку. Такі комбінації препаратів можуть бути комбінацією препаратів, які використовуються в хіміотерапії, як то комбінації препаратів, які застосовуються в режимі хіміотерапії FOLFIRINOX.

Комбінація препаратів, яка використовується при хіміотерапії FOLFIRINOX, включає лейковорин, фторурацил, іринотекан (як то іринотекан гідрохлорид) і оксаліплатин. Оксаліплатин може вводитися в дозі 85 мг/м<sup>2</sup> площі поверхні тіла; іринотекан у дозі 180 мг/м<sup>2</sup>; лейковорин у дозі 400 мг/м<sup>2</sup>; і фторурацил у дозі 400 мг/м<sup>2</sup> у вигляді болюса з подальшим введенням 5-фторурацилу в дозі 2400 мг/м<sup>2</sup> у вигляді безперервної інфузії бажано протягом 46 год., бажано кожних 2 тижні.

Термін "фолінова кислота" або "лейковорин" відноситься до сполуки, яка застосовується в синергійній комбінації з хіміотерапевтичним засобом 5-фторурацилом. Так, якщо тут згадується введення 5-фторурацилу або його форми проліків, то таке введення в одному втіленні може включати введення в комбінації з фоліновою кислотою. Фолінова кислота має наступну формулу:





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

Т-клітини  $\gamma\delta$  (Т-клітини гамма-дельта) становлять невелику підмножину Т-клітин, які мають особливі Т-клітинні рецептори (TCR) на своїй поверхні. У більшості Т-клітин TCR складаються із двох глікопротеїдних ланцюгів, які називаються  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгами TCR. На противагу цьому, у Т-клітин  $\gamma\delta$  TCR складаються з одного  $\gamma$ -ланцюга й одного  $\delta$ -ланцюга. Ця група Т-клітин звичайно набагато менш поширена, ніж Т-клітини  $\alpha\beta$ . Т-клітини  $\gamma\delta$  людини відіграють важливу роль у реакціях стресового нагляду типу інфекційних захворювань і аутоімунітета. Також передбачається, що викликані трансформацією зміни в пухлинах викликають реакції стресового нагляду, опосередковані Т-клітинами  $\gamma\delta$ , і підсилюють протипухлинний імунітет. Важливо відзначити, що активовані після впливу антигену Т-клітини  $\gamma\delta$  у вогнищі ушкодження забезпечують цитокіни (наприклад,  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) і/або хемокіни, які опосередковують залучення (рекрутмент) інших ефektorних клітин, і проявляють безпосередні ефektorні функції, такі як цитотоксичність (через рецептори смерті й шляхи цитолітичних гранул) і ADCC.

Більшість Т-клітин  $\gamma\delta$  у периферійній крові експресують Т-клітинний рецептор  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  ( $\text{TCR}\gamma\delta$ ). Т-клітини  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  унікальні для людини й приматів і передбачається, що вони відіграють ранню й найважливішу роль у сприйнятті "небезпеки" при вторгненні патогенів, оскільки їхня кількість сильно зростає при багатьох гострих інфекціях і за кілька днів може перевищити всі інші лімфоцити, наприклад, при туберкульозі, сальмонельозі, ерліхіозі, бруцельозі, туляремії, лістеріозі, токсоплазмозі й малярії.

Т-клітини  $\gamma\delta$  реагують на невеликі непептидні фосфорильовані антигени (фосфоантигени) типу пірофосфатів, які синтезуються в бактеріях, і ізопентеніл-пірофосфатів (IPP) ссавців, які виробляються в клітинах, через мевалонатний шлях. У той час, як продукування IPP у нормальних клітинах є недостатнім для активації Т-клітин  $\gamma\delta$ , порушення регуляції мевалонатного шляху в пухлинних клітинах призводить до нагромадження IPP і активації Т-клітин  $\gamma\delta$ . Рівень IPPs також може й терапевтично підвищуватися амінобісфонатами, які інгібують фермент мевалонатного шляху - фарнезил-пірофосфатсинтазу (FPPS). Серед іншого, такі амінобісфонати представлені золедроновію кислотою (ZA, золедронат, Zometa<sup>TM</sup>, Novartis), яка вже застосовується клінічно на пацієнтах для лікування остеопорозу й метастатичних захворювань кісток. Після обробки PBMCs *in vitro* ZA особливо поглинається моноцитами. IPP накопичуються в моноцитах, які диференціюються в антиген-презентуючі клітини, що стимулюють розвиток Т-клітин  $\gamma\delta$ . При цьому бажаним є додавання інтерлейкіну-2 (IL-2) як фактора росту й виживання для активованих Т-клітин  $\gamma\delta$ . Нарешті, були описані деякі алкільовані аміни, які активують Т-клітини  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  *in vitro*, але тільки в мілімолярних концентраціях.

Відповідно до винаходу, термін "засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ " відноситься до сполук, які стимулюють розвиток Т-клітин  $\gamma\delta$ , зокрема Т-клітин  $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ , *in vitro* і/або *in vivo*, зокрема, викликаючи активацію й експансію Т-клітин  $\gamma\delta$ . Бажано цей термін відноситься до сполук, які *in vitro* і/або *in vivo* підвищують продукцію ізопентеніл-пірофосфатів (IPP) ссавців, які виробляються в клітинах, переважно шляхом інгібування ферменту мевалонатного шляху - фарнезил-пірофосфатсинтази (FPPS).

Однією із кращих груп сполук, які стимулюють Т-клітини  $\gamma\delta$ , є бісфонати, особливо азотовмісні бісфонати (N-бісфонати; амінобісфонати).

Наприклад, придатними бісфонатами для застосування у винаході можуть бути одна або кілька з поміж наступних сполук, включаючи їх аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, ефіри, кон'югати й форми проліків:

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

(дихлорфосфоно-метил)фосфонова кислота, наприклад, клодронат;

{1-гідрокси-3-[метил(пентил)аміно]пропан-1,1-диїл}біс(фосфонова кислота), тобто ібандронова кислота, наприклад, ібандронат;

(3-аміно-1-гідроксипропан-1,1-диїл)біс(фосфонова кислота), тобто памідронова кислота, наприклад, памідронат;

5 (1-гідрокси-1-фосфоно-2-піридин-3-іл-етил)фосфонова кислота, тобто ризедронова кислота, наприклад, ризедронат;

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

10 [3-(диметиламіно)-1-гідроксипропан-1,1-диїл]біс(фосфонова кислота), тобто олпадроронова кислота;

[4-аміно-1-гідрокси-1-(гідрокси-оксидофосфорил)бутил]фосфонова кислота, тобто алендроронова кислота, наприклад, алендронат;

[(циклогептиламіно) метилен]біс(фосфонова кислота), тобто інкадроронова кислота;

15 (1-гідроксиетан-1,1-диїл)біс(фосфонова кислота), тобто етидроронова кислота, наприклад, етидронат; та

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

Відповідно до винаходу, найкращим бісфонатом є золедроронова кислота (INN) або золедронат (продається фірмою Novartis під торговельними марками Zometa, Zomera, Aclasta і Reclast). Zometa застосовується для запобігання скелетним переломам у хворих на рак типу

20 множинної мієломи й рак простати, а також для лікування остеопорозу. Вона також може застосовуватися для лікування гіперкальціємії при раку й може бути корисною для лікування болю при метастазах у кістках.

В одному з найкращих втілень, засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$  відповідно до винаходу, уводиться в комбінації з IL-2. Така комбінація, як було показано, особливо ефективно

25 опосередковує експансію й активацію Т-клітин  $\gamma\delta$ 2.

Інтерлейкін-2 (IL-2) є інтерлейкіном, сигнальною молекулою цитокінівого типу в імунній системі. Це білок, який залучає лімфоцити і є частиною природної відповіді організму на мікробні інфекції, а також бере участь у розрізненні чужих (не своїх) і власних антигенів. IL-2

30 опосередковує свої ефекти шляхом зв'язування з рецепторами IL-2, які експресуються лімфоцитами.

При застосуванні відповідно до винаходу IL-2 може бути будь-яким IL-2, який підтримує або сприяє стимуляції Т-клітин  $\gamma\delta$ , і може походити з будь-якого виду, бажано людини. IL-2 може бути виділеним, отриманим рекомбінантно або синтетичним IL-2, а також може бути природного походження або модифікованим IL-2.

35 Термін "антиген" відноситься до таких речовин, як білки або пептиди, які містять епітоп, проти якого спрямована і/або повинна бути спрямована імунна відповідь. У кращому втіленні антиген є пухлинним антигеном типу CLDN18.2, тобто компонентом ракових клітин, який може походити із цитоплазми, клітинної поверхні або клітинного ядра, зокрема, таким антигеном, який виробляється, бажано у великій кількості, усередині клітини або як поверхневий антиген на

40 ракових клітинах.

У даному винаході термін "асоційований з пухлиною (пухлинний) антиген" бажано відноситься до таких білків, які за нормальних умов специфічно експресуються в обмеженій кількості тканин і/або органів або на певних етапах онтогенезу й експресуються або аномально експресуються в одній або декількох пухлинних або ракових тканинах. У даному винаході

45 пухлинні антигени бажано пов'язані із клітинною поверхнею ракових клітин і бажано не експресуються або рідко експресуються в нормальних тканинах.

Термін "епітоп" відноситься до антигенних детермінантів у молекулах, тобто тієї частини молекул, яка розпізнається імунною системою, наприклад, розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи є дискретними, тривимірними сайтами на антигенах, які розпізнаються імунною

50 системою. Як правило, епітопи складаються з хімічно активних поверхневих груп молекул типу амінокислот або бічних ланцюгів цукрів і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики зарядів. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першими, але не з останніми втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Епітопи таких білків, як CLDN18.2, бажано включають

55 безперервну або переривчасту ділянку даного білка довжиною бажано від 5 до 100, бажано від 5 до 50, краще від 8 до 30, найкраще від 10 до 25 амінокислот, наприклад, епітоп може мати довжину бажано 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 амінокислот.

Термін "антитіло" відноситься до глікопротеїнів, які містять щонайменше два важкі (H) ланцюги й два легкі (L) ланцюги, зв'язані між собою дисульфідними зв'язками, і включає будь-які

60 молекули, які містять антигензв'язувальні ділянки. Термін "антитіло" включає моноклональні

антитіла й фрагменти або похідні антитіл, у тому числі, без обмеження, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, наприклад, scFv, і антиген-зв'язувальні фрагменти антитіл, такі як фрагменти Fab і Fab', а також включає всі рекомбінантні форми антитіл, наприклад, антитіла, експресовані в прокаріотах, неглікозильовані антитіла, а також будь-які антигензв'язувальні фрагменти й похідні антитіл, як описано тут. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено  $V_H$ ) і константної області важкого ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (скорочено  $V_L$ ) і константної області легкого ланцюга. Області  $V_H$  і  $V_L$  можуть ще далі підрозділятися на ділянки гіперваріабельності, які називаються ділянками, які визначають комплементарність (CDR), які перемижуються з більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна область  $V_H$  і  $V_L$  складається із трьох CDR і чотирьох FR, які розташовуються від N-кінця до C-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого й легкого ланцюгів містять зв'язувальний домен, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Описані тут антитіла можуть бути людськими антитілами. Термін "людське антитіло" у даному винаході позначає антитіла, які мають варіабельні й константні області, що походять з послідовностей імуноглобулінів людини зародкової лінії. Описані тут людські антитіла можуть містити залишки амінокислот, не кодованих послідовностями імуноглобулінів людини зародкової лінії (наприклад, мутації, введені випадковим чином або методом сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або за допомогою соматичної мутації *in vivo*).

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до молекул, у яких антигензв'язувальні сайти в основному походять із імуноглобулінів інших видів, крім людини, тоді як в основі іншої імуноглобулінової структури молекули знаходиться структура й/або послідовність імуноглобуліну людини. Антигензв'язувальні сайти можуть або містити повні варіабельні домени, вбудовані в константні домени, або тільки гіперваріабельні ділянки (CDR), вбудовані у відповідні каркасні ділянки варіабельних доменів. Антигензв'язувальні ділянки можуть бути дикого типу або модифіковані заміною однієї або декількох амінокислот, наприклад, модифіковані так, щоб бути більш подібними до імуноглобулінів людини. У деяких форм гуманізованих антитіл зберігаються всі послідовності CDR (наприклад, гуманізоване антитіло миші, яке містить усі шість CDR з антитіла миші). В інших форм одна або кілька ділянок CDR зазнали змін у порівнянні з вихідним антитілом.

Термін "химерне антитіло" відноситься до таких антитіл, у яких одна частина кожної з амінокислотних послідовностей важких і легких ланцюгів гомологічна до відповідних послідовностей антитіл, які походять з певного виду або належать до певного класу, а інші сегменти ланцюга гомологічні до відповідних послідовностей в інших. Як правило, варіабельні області легких і важких ланцюгів відтворюють варіабельні області антитіл, які походять від одного виду ссавців, а константні області гомологічні до послідовності антитіл, які походять від інших. Однією з очевидних переваг таких химерних форм є те, що варіабельна область може бути легко отримана з відомих на даний час джерел за допомогою легкодоступних В-клітин або гібридом з інших організмів, крім людей, у комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, із препаратів клітин людини. У той час, як варіабельна область має перевагу в легкості одержання, а специфічність її не залежить від джерела, то константна область, отримана від людини, з меншою ймовірністю буде викликати імунну відповідь у суб'єкта-людини при введенні антитіл, ніж якби константна область походила з іншого із джерела, крім людини. Однак це визначення не обмежується даним конкретним прикладом.

Терміни "антигензв'язувальна частина" антитіла (або просто "зв'язувальна частина") або "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла (або просто "зв'язувальний фрагмент") або подібні терміни відносяться до одного або декількох фрагментів, які зберігають здатність антитіла до специфічного зв'язування з антигеном. Було показано, що антигензв'язувальна функція антитіл може виконуватися фрагментами повнорозмірних антитіл. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплені терміном "антигензв'язувальна частина" антитіла, включають: (i) Fab-фрагменти, моновалентні фрагменти, які складаються із доменів  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  і  $C_H$ ; (ii)  $F(ab')_2$ -фрагменти, бівалентні фрагменти, які містять два двовалентні Fab-фрагменти, з'єднаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагменти, які складаються із доменів  $V_H$  і  $C_H$ ; (iv) Fv-фрагменти, які складаються із доменів  $V_L$  і  $V_H$  на одному плечі антитіла; (v) dAb-фрагменти (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546), які складаються з домена  $V_H$ ; (vi) виділені ділянки, які визначають комплементарність (CDR); і (vii) комбінації із двох або декількох виділених CDR, які

необов'язково можуть з'єднуватися через синтетичний лінкер. Крім того, хоча два домена Fv-фрагмента, V<sub>L</sub> і V<sub>H</sub>, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати, рекомбінантними методами, за допомогою синтетичного лінкера, який дозволяє їм утворювати один білковий ланцюг, у якому поєднуються області V<sub>L</sub> і V<sub>H</sub> з утворенням моновалентних молекул (відомих як

5 одноклановий Fv (scFv), наприклад, див. Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такі однокланові антитіла теж охоплюються терміном "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла. Наступний приклад - злиті білки зв'язувального домена імуноглобуліну, які включають: (i) поліпептид зв'язувального домена, злитий з поліпептидом шарнірної ділянки імуноглобуліну, (ii) константну область C<sub>H2</sub> важкого

10 ланцюга імуноглобуліну, зливу із шарнірною ділянкою, і (iii) константну область C<sub>H3</sub> важкого ланцюга імуноглобуліну, зливу з константною областю C<sub>H2</sub>. Поліпептид зв'язувального домена може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Злиті білки зв'язувального домена імуноглобуліну більш докладно розкриті в US 2003/0118592 і US 2003/0133939. Ці фрагменти антитіл одержують стандартними методами,

15 відомими фахівцям у даній галузі, і фрагменти піддають скринінгу щодо можливості застосування у такий же спосіб, як і інтактні антитіла.

Термін "біспецифічні молекули" служить для позначення таких агентів, наприклад, білків, пептидів або білкових чи пептидних комплексів, які мають дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися або взаємодіяти з (а) антигеном на клітинній поверхні й

20 (b) Fc-рецептором на поверхні ефекторної клітини. Термін "поліспецифічна молекула" або "гетероспецифічна молекула" служить для позначення таких агентів, наприклад, білків, пептидів або білкових або пептидних комплексів, які мають більше двох різних специфічностей зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися або взаємодіяти з (а) антигеном на клітинній поверхні, (b) Fc-рецептором на поверхні ефекторної клітини й (c) щонайменше ще з

25 одним компонентом. Відповідно, винахід включає, без обмеження, біспецифічні, триспецифічні, тетраспецифічні й інші мультиспецифічні молекули, які спрямовані на CLDN18.2 та інші мішені, як то Fc-рецептори на ефекторних клітинах. Термін "біспецифічні антитіла" також включає діатіла. Діатіла є бівалентними біспецифічними антитілами, у яких домени V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> експресуються на одному й тому ж поліпептидному ланцюзі, але за допомогою такого лінкера,

30 який занадто короткий для утворення зв'язку між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі, що змушує домени зв'язуватися з комплементарними доменами на іншому ланцюзі, утворюючи два антигензв'язувальних сайти (наприклад, див. Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Антитіло можна кон'югувати із терапевтичною молекулою або засобом, як то цитотоксином, лікарським препаратом (наприклад, імунодепресантом) або радіоізотопом. Цитотоксини або цитотоксичні засоби включають будь-які засоби, які приносять шкоду й, зокрема, убивають клітини. Приклади включають таксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидію бромід, еметин, митоміцин, етопозид, вінкристин, тенопозид, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксиантрацидін, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і пуроміцин та їх аналоги або

40 гомологи. Придатні терапевтичні засоби для одержання кон'югатів антитіл включають, без обмеження, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил, дакарбазин), алкилюючі засоби (наприклад, мехлоретамін, тіопа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфан, дибромманітол, стрептозотозин, митоміцин С і цис-дихлордиамінплатина(II) (DDP, цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (АМС) і анти-мітотичні засоби (наприклад, вінкристин і вінбластин). У кращому втіленні терапевтичний засіб представлений цитотоксичним засобом або радіотоксичним засобом. В іншому втіленні

50 терапевтичний засіб представлений імунодепресантом. У наступному втіленні терапевтичний засіб представлений GM-CSF. У кращому втіленні терапевтичним засобом служить доксорубіцин, цисплатин, блеоміцин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамід або рицин А.

Антитіла також можна кон'югувати із радіоізотопами, наприклад, з йодом-131, ітрієм-90 або індієм-111, одержуючи цитотоксичні радіофармпрепарати.

Кон'югати антитіл запропонованих винаходом можуть застосовуватися для модифікації заданої біологічної відповіді, а молекули лікарських засобів не повинні обмежуватися класичними хімічними терапевтичними засобами. Наприклад, молекула лікарського засобу може бути білком або поліпептидом, яка має необхідну біологічну активність. Такі білки можуть

60 включати, наприклад, ферментативно активні токсини або їх активні фрагменти, як то абрин,

рицин А, екзотоксин *Pseudomonas* або дифтерійний токсин; такі білки, як фактор некрозу пухлин або  $\gamma$ -інтерферон; або модифікатори біологічних відповідей, такі, наприклад, як лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF") або інші фактори росту.

Методи кон'югування таких терапевтичних молекул з антитілами добре відомі, наприклад, див. 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 antibodies in cancer therapy", in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), i Thorpe et al., "The Preparation and cytotoxic properties of antibody-toxin conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

У даному винаході антитіло "походить від" певної послідовності зародкової лінії, якщо воно отримане із системи шляхом імунізації тварини або скринінга бібліотеки імуноглобулінових генів, причому обране антитіло за амінокислотною послідовністю щонайменше на 90 %, краще 95 %, ще краще щонайменше на 96 %, 97 %, 98 % або на 99 % є ідентичним до амінокислотної послідовності, яка кодується імуноглобуліновим геном зародкової лінії. Як правило, антитіло, яке походить від певної послідовності зародкової лінії, повинне проявляти відмінності не більше ніж за 10 амінокислотами, краще не більше ніж за 5 або ще краще не більше ніж за 4, 3, 2 або за 1 амінокислотою від амінокислотної послідовності, яка кодується імуноглобуліновим геном зародкової лінії.

У даному винаході термін "гетероантитіла" відноситься до з'єднаних одне з одним двох або декількох антитіл, їх похідних або антигензв'язувальних ділянок, причому принаймні два з них мають різні специфічності. Ці різні специфічності включають специфічність зв'язування для Fc-рецепторів на ефекторних клітинах і специфічність зв'язування з антигеном або епітопом на клітинах мішені, наприклад, пухлинних клітинах.

Описані тут антитіла можуть бути моноклональними антитілами. Термін "моноклональне антитіло" у даному винаході відноситься до препаратів молекул антитіл одного молекулярного складу. Моноклональне антитіло проявляє лише одну специфічність зв'язування й спорідненість. В одному втіленні моноклональні антитіла виробляються гібридомою, яка включає В-клітини, отримані від тварини, а не людини, наприклад, миші, злиті з іморталізованими клітинами.

Описані тут антитіла можуть бути рекомбінантними антитілами. Термін "рекомбінантне антитіло" у даному винаході включає всі антитіла, які отримані, експресовані, створені або виділені рекомбінантними методами, як то (a) антитіла, виділені з таких тварин (наприклад, мишей), які є трансгенними або трансхромосомними відносно генів імуноглобулінів або гібридами, з якої вони отримані, (b) антитіла, виділені із клітин хазяїна, трансформованих для експресії антитіл, наприклад, із трансфектоми, (c) антитіла, виділені з рекомбінантної або комбінаторної бібліотеки антитіл, і (d) антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими методами, які включають сплайсинг послідовностей генів імуноглобулінів з іншими послідовностями ДНК.

Описані тут антитіла можуть походити від різних видів, у тому числі, без обмеження, мишей, пацюків, кроликів, морських свинок і людини.

Описані тут антитіла включають поліклональні й моноклональні антитіла й охоплюють антитіла типу IgA, як то IgA1 або IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM і IgD. У різних втіленнях антитіла є антитілами типу IgG1, краще антитілами типу IgG1 ізотипа каппа або лямбда (тобто IgG1,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), антитілами типу IgG2a (наприклад, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), антитілами типу IgG2b (наприклад, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), антитілами типу IgG3 (наприклад, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) або антитілами типу IgG4 (наприклад, IgG4,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Термін "трансфектома" у даному винаході охоплює рекомбінантні еукаріотичні клітини хазяїна, які експресують антитіла, як то клітини CHO, клітини NS/O, клітини HEK293, клітини HEK293T, рослинні або грибові клітини, у тому числі дріжджові клітини.

У даному винаході термін "гетерологічне антитіло" визначається стосовно трансгенних організмів, які виробляють такі антитіла. Цей термін відноситься до антитіл, у яких амінокислотна послідовність або, кодуєча послідовність нуклеїнової кислоти відповідає тій, яка перебуває в організмі, який не є трансгенним, і звичайно походить від іншого виду, ніж трансгенний організм.

У даному винаході "гетерогібридне антитіло" означає таке антитіло, у якого легкі й важкі ланцюги походять із різних організмів. Наприклад, антитіло, у якого важкий ланцюг людини пов'язаний з легким ланцюгом миші, є гетерогібридним антитілом.

Винахід охоплює всі описані тут антитіла й похідні антитіл, які для цілей даного винаходу охоплюються терміном "антитіло". Термін "похідні" антитіл відноситься до будь-яких модифікованих форм антитіл, наприклад, кон'югатів антитіл з іншими молекулами або антитілами або фрагментами антитіл.

Описані тут антитіла бажано є виділеними. Термін "виділене антитіло" у даному винаході служить для позначення таких антитіл, які практично вільні від інших антитіл, які мають іншу антигенну специфічність (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN18.2, практично вільне від антитіл, які специфічно зв'язуються з іншими антигенами, ніж CLDN18.2). Однак виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом CLDN18.2 людини, може мати перехресну реактивність із іншими спорідненими антигенами, наприклад, з іншого виду (наприклад, з видовими гомологами CLDN18.2). Більше того, виділене антитіло може бути практично вільним від іншого клітинного матеріалу й/або хімічних речовин. В одному втіленні винаходу комбінація "виділених" моноклональних антитіл відноситься до антитіл, які мають різну специфічність й об'єднані у чітко визначені композиції або суміші.

Термін "зв'язування" відповідно до винаходу бажано відноситься до специфічного зв'язування.

Відповідно до даного винаходу, антитіло здатне зв'язуватися із заданою мішенню, якщо воно має значну спорідненість до цієї заданої мішені й зв'язується з нею у стандартних аналізах. "Спорідненість" або "спорідненість зв'язування" часто визначається рівноважною константою дисоціації ( $K_D$ ). Бажано термін "істотна спорідненість" означає зв'язування із заданою мішенню з константою дисоціації ( $K_D$ )  $10^{-5}$  М або менше,  $10^{-6}$  М або менше,  $10^{-7}$  М або менше,  $10^{-8}$  М або менше,  $10^{-9}$  М або менше,  $10^{-10}$  М або менше,  $10^{-11}$  М або менше або  $10^{-12}$  М або менше.

Антитіло (практично) не здатне зв'язуватися з мішенню, якщо воно не має істотної спорідненості до даної мішені й практично не зв'язується, зокрема, зв'язування з даною мішенню не виявляється стандартними аналізами. Бажано, зв'язування антитіла з даною мішенню не виявляється, якщо воно присутнє в концентрації аж до 2, бажано 10, краще 20, зокрема, 50 або 100 мкг/мл або більше. Бажано антитіло не має істотної спорідненості до мішені, якщо воно зв'язується з даною мішенню з  $K_D$ , який щонайменше в 10 разів, 100 разів,  $10^3$  разів,  $10^4$  разів,  $10^5$  разів або  $10^6$  разів вищий, ніж  $K_D$  зв'язування з такою мішенню, з якою антитіло здатне зв'язуватися. Наприклад, якщо  $K_D$  зв'язування антитіла з такою мішенню, з якою антитіло здатне зв'язуватися, становить  $10^{-7}$  М, то  $K_D$  зв'язування з мішенню, до якої антитіло не має істотної спорідненості, буде становити не менше  $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-4}$  М,  $10^{-3}$  М,  $10^{-2}$  М або  $10^{-1}$  М.

Антитіло є специфічним для заданої мішені, якщо воно здатне зв'язуватися із цією заданою мішенню, але не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, тобто не має істотної спорідненості з іншими мішенями і не зв'язується з іншими мішенями суттєво в стандартних аналізах. Відповідно до винаходу, антитіло є специфічним для CLDN18.2, якщо воно здатне зв'язуватися з CLDN18.2, але (практично) не здатне зв'язуватися з іншими мішенями. Бажано антитіло є специфічним для CLDN18.2, якщо спорідненість або здатність до зв'язування з такими іншими мішенями суттєво не перевищує спорідненості або здатності до зв'язування з неспорідненими CLDN18.2 білками, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, сироватковий альбумін людини (HSA), або ж з трансмембранними білками відмінними, від клаудину, типу молекул МНС або рецепторів трансферину, або з будь-якими іншими такими поліпептидами. Бажано антитіло є специфічним для заданої мішені, якщо воно зв'язується з даною мішенню з  $K_D$ , який щонайменше в 10 разів, 100 разів,  $10^3$  разів,  $10^4$  разів,  $10^5$  раз або  $10^6$  раз нижчий, ніж  $K_D$  зв'язування з такою мішенню, для якої воно не є специфічним. Наприклад, якщо  $K_D$  зв'язування антитіла з такою мішенню, для якої воно є специфічним, становить  $10^{-7}$  М, то  $K_D$  зв'язування з мішенню, для якої воно не є специфічним, буде становити не менше  $10^{-6}$  М,  $10^{-5}$  М,  $10^{-4}$  М,  $10^{-3}$  М,  $10^{-2}$  М або  $10^{-1}$  М.

Зв'язування антитіла з мішенню можна визначити експериментально будь-яким придатним методом, наприклад, див. Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" in Fundamental Immunology, Paul W.E., ed., Raven Press, New York, NY (1984); Kuby & Janis, Immunology, W.H. Freeman and Company, New York, NY (1992); а також описаними тут методами. Спорідненість легко визначається стандартними методами, такими як метод рівноважного діалізу; за допомогою приладу Biorad 2000, використовуючи загальні процедури, викладені виробником; методом радіоімуноаналіза з використанням радіоактивного антигену-мішені; або іншим

методом, відомим фахівцям у даній галузі. Дані щодо спорідненості можна аналізувати, наприклад, методом Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci, 51:660 (1949). Визначена спорідненість конкретної взаємодії антитіло-антиген може змінюватися при вимірюванні за різних умов, наприклад, концентрації солі, рН. Тому вимірювання спорідненості й інших параметрів зв'язування з антигеном, наприклад, KD, IC<sub>50</sub>, бажано проводяться зі стандартними розчинами антитіла й антигену й стандартизованим буфером.

У даному винаході термін "ізотип" позначає клас антитіл (наприклад, IgM або IgG1), який кодується генами константної області важкого ланцюга.

У даному винаході термін "перемикання ізотипа" відноситься до явища, при якому клас або ізотип антитіла міняється з одного класу Ig на один з інших класів Ig.

Термін "який зустрічається в природі" або "природний" у даному винаході стосовно об'єкта означає те, що об'єкт зустрічається в природі. Наприклад, послідовність поліпептиду або полінуклеотида, яка присутня в організмі (включаючи віруси) і яка може бути виділеною із природного джерела й не була штучно модифікована людиною в лабораторії, є природною.

Термін "перестановка" у даному винаході відноситься до такої конфігурації локусу важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобуліну, при якому V-сегмент розташовується безпосередньо поруч із сегментом D-J або J у конформації, що кодує практично повний домен V<sub>H</sub> або V<sub>L</sub>, відповідно. Перебудова локусу гена імуноглобуліну (антитіла) виявляється при співрозмірні із зародковою ДНК; при перебудові локус буде містити принаймні один рекомбінований елемент гомології типу гептамера/нонамера.

Термін "неперебудована" або "зародкова конфігурація" у даному винаході щодо V-сегменту відноситься до такої конфігурації, при якій V-сегмент не зазнав рекомбінації й тому не перебуває безпосередньо поруч із сегментом D або J.

Відповідно до винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, представлене антитілом, здатним зв'язуватися з епітопом, присутнім в CLDN18.2, бажано з епітопом, розташованим у позаклітинних доменах CLDN18.2, зокрема, у першому позаклітинному домені, бажано в положенні амінокислот від 29 до 78 в CLDN18.2. В окремих втіленнях антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, представлене антитілом, здатним зв'язуватися з (i) таким епітопом на CLDN18.2, якого немає на CLDN18.1, бажано SEQ ID NO: 3, 4 і 5, (ii) епітопом, розташованим на петлі 1 CLDN18.2, бажано SEQ ID NO: 8, (iii) епітопом, розташованим на петлі 2 CLDN18.2, бажано SEQ ID NO: 10, (iv) епітопом, розташованим на петлі D3 CLDN18.2, бажано SEQ ID NO: 11, (v) епітопом, який охоплює петлю 1 CLDN18.2 і петлю D3 CLDN18.2, або (vi) неглікозильованим епітопом, розташованим на петлі D3 CLDN18.2, бажано SEQ ID NO: 9.

Відповідно до винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано представлене антитілом, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, але не CLDN18.1. Бажано антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним до CLDN18.2. Бажано антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, представлене антитілом, яке має здатність до зв'язування з CLDN18.2, експресованим на клітинній поверхні. В найкращих втіленнях антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з нативними епітопами CLDN18.2, присутніми на поверхні живих клітин. Бажано антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з одним або декількома пептидами, обраними із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46, 48-50. Бажано антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним до вищезгаданих білків, пептидів або їх імуногенних фрагментів або похідних. Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, може бути отримане способом, який передбачає стадію імунізації тварини білком або пептидом, які містять амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46 і 48-50, або нуклеїновою кислотою або клітинами хазяїна, які експресують даний білок або пептид. Бажано антитіло зв'язується з раковими клітинами, зокрема клітинами наведених вище типів рака, і бажано практично не зв'язується з нерakovими клітинами.

Бажано зв'язування антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, із клітинами, які експресують CLDN18.2, індукує або опосередковує знищення клітин, які експресують CLDN18.2. Клітини, які експресують CLDN18.2, бажано представлені раковими клітинами, зокрема, обраними із групи, яка складається з пухлинних клітин раку шлунка, стравоходу, підшлункової залози, легенів, яєчників, товстої кишки, печінки, голови й шиї й жовчного міхура. Бажано антитіло індукує або опосередковує знищення клітин шляхом індукції одного або декількох із числа опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинної цитотоксичністю (ADCC) лізису, апоптоза й інгібування проліферації клітин, які експресують CLDN18.2. Бажано опосередкований ADCC лізис клітин відбувається в присутності ефекторних клітин, які в окремих втіленнях вибирають із

групи, яка складається з моноцитів, мононуклеаров, NK-клітин і PMNs. Інгібування проліферації клітин можна вимірювати *in vitro* шляхом визначення проліферації клітин методом з використанням бромдезоксидуридину (5-бром-2-дезоксидуридину, BrdU). BrdU – синтетичний нуклеозид, який є аналогом тимідину й може включатися в новосинтезовану ДНК при реплікації клітин (під час фази S клітинного циклу) замість тимідину під час реплікації ДНК. Виявлення його включення, наприклад, за допомогою антитіл, специфічних до BrdU, указує на те, що в клітинах відбувалася активна реплікація ДНК.

У кращих втіленнях описані тут антитіла характеризуються одним або декількома з наступних властивостей:

- а) специфічність до CLDN18.2;
- б) спорідненість зв'язування з CLDN18.2 становить близько 100 нм або менше, бажано 5-10 нм або менше, краще 1-3 нм або менше;
- в) здатність індукувати або опосередковувати CDC на CLDN18.2-позитивних клітинах;
- г) здатність індукувати або опосередковувати ADCC на CLDN18.2-позитивних клітинах;
- д) здатність інгібувати ріст CLDN18.2-позитивних клітин;
- е) здатність індукувати апоптоз CLDN18.2-позитивних клітин.

В найкращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, виробляється гібридомою, депонованою в DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Німеччина; нова адреса: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Німеччина), яка має наступне позначення й номер доступу:

- а). 182-D1106-055, номер доступу DSM ACC2737, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- б). 182-D1106-056, номер доступу DSM ACC2738, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- в). 182-D1106-057, номер доступу DSM ACC2739, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- г). 182-D1106-058, номер доступу DSM ACC2740, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- д). 182-D1106-059, номер доступу DSM ACC2741, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- е). 182-D1106-062, номер доступу DSM ACC2742, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- ж). 182-D1106-067, номер доступу DSM ACC2743, депоновано 19 жовтня 2005 р.,
- з). 182-D758-035, номер доступу DSM ACC2745, депоновано 17 листопада 2005 р.,
- и). 182-D758-036, номер доступу DSM ACC2746, депоновано 17 листопада 2005 р.,
- й). 182-D758-040, номер доступу DSM ACC2747, депоновано 17 листопада 2005 р.,
- к). 182-D1106-061, номер доступу DSM ACC2748, депоновано 17 листопада 2005 р.,
- л). 182-D1106-279, номер доступу DSM ACC2808, депоновано 26 жовтня 2006 р.,
- м). 182-D1106-294, номер доступу DSM ACC2809, депоновано 26 жовтня 2006 р.,
- н). 182-D1106-362, номер доступу DSM ACC2810, депоновано 26 жовтня 2006 р.

Кращими антитілами запропонованими винаходом є антитіла, які виробляються та їх одержують із вищеописаних гібридом, тобто 37G11 у випадку 182-D1106-055, 37H8 у випадку 182-D1106-056, 38G5 у випадку 182-D1106-057, 38H3 у випадку 182-D1106-058, 39F11 у випадку 182-D1106-059, 43A11 у випадку 182-D1106-062, 61C2 у випадку 182-D1106-067, 26B5 в випадку 182-D758-035, 26D12 у випадку 182-D758-036, 28D10 у випадку 182-D758-040, 42E12 у випадку 182-D1106-061, 125E1 у випадку 182-D1106-279, 163E12 у випадку 182-D1106-294 і 175D10 у випадку 182-D1106-362; та їх химерні й гуманізовані форми.

Кращі химерні антитіла і їх послідовності представлені в наступній таблиці.



Таблиця

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

У кращих втіленнях антитіла, зокрема химеризовані форми антитіл запропонованих винаходом, включають антитіла, які містять константну область важкого ланцюга (C<sub>H</sub>) амінокислотну послідовність, що містить, відбувається з константної області важкого ланцюга людини, як то амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 13, або її фрагмент. В інших кращих втіленнях антитіла, зокрема химеризовані форми антитіл запропонованих винаходом, включають антитіла, які містять константну область легкого ланцюга (C<sub>L</sub>) амінокислотну послідовність, що містить, відбувається з константної області легкого ланцюга людини, як то амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 12, або її фрагмент. В найкращому втіленні антитіла, зокрема химеризовані форми антитіл запропонованих винаходом, включають антитіла, які містять C<sub>H</sub> амінокислотну послідовність, що містить, відбувається з C<sub>H</sub> людини, як то амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 13, або її фрагмент, а також містять C<sub>L</sub> амінокислотну послідовність, що містить, відбувається з C<sub>L</sub> людини, як то амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 12, або її фрагмент.

В одному втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, представлене химерним моноклональним антитілом миші/людини типу IgG1, що включають варіабельну область легкої каппа-ланцюги миші, константну область легкої каппа-ланцюги алотипа Km (3) людини, варіабельну область важкого ланцюга миші, і константну область IgG1 алотипа G1m (3) людини.

У деяких кращих втіленнях химеризовані форми антитіл включають антитіла, які містять важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19 та їх фрагментів, і/або ті, які містять легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 і їхніх фрагментів.

У деяких кращих втіленнях химеризовані форми антитіл включають антитіла, які містять комбінацію важких ланцюгів і легких ланцюгів, обрану з наступних можливих варіантів від (i) до (ix):

(i) важкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 14, або її фрагмент, а легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 21, або її фрагмент,

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

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

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

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

фрагмент, а легкий ланцюг містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 24, або її фрагмент,

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

5 або її фрагмент,

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

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

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

15 “Фрагмент” або “фрагмент амінокислотної послідовності”, що приводяться вище, відносяться до частини послідовності антитіла, тобто послідовності, яка є послідовністю антитіла, укорочену на N- і/або C-кінці, у якій, коли вона заміняє дану послідовність в антитілі, зберігається зв'язування даного антитіла з CLDN18.2 і бажано зберігаються функції даного антитіла, описані тут, наприклад, опосередкованого CDC лізису або опосередкованого ADCC лізису. Бажано  
20 фрагмент амінокислотної послідовності містить щонайменше 80 %, бажано щонайменше 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % амінокислотних залишків з даної амінокислотної послідовності. Фрагмент амінокислотної послідовності, обраної із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 і 28, бажано означає те, що з даної послідовності вилучено 17, 18, 19, 20, 21, 22 або 23 амінокислоти на N-кінці.

25 У кращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить варіабельну область важкого ланцюга ( $V_H$ ) амінокислотну послідовність, що містить, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 і їх фрагментів.

У кращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить варіабельну область легкого ланцюга ( $V_L$ ) амінокислотну послідовність, що містить, обрану із  
30 групи, яка складається з SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 і їх фрагментів.

У деяких кращих втіленнях антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить комбінацію варіабельної області важкому ланцюга ( $V_H$ ) і варіабельної області легкого ланцюга ( $V_L$ ), обрану з наступних можливих варіантів від (i) до (ix):

(i)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 29, або її фрагмент, а  
35  $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36, або її фрагмент,

(ii)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 30, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 35, або її фрагмент,

(iii)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 31, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37, або її фрагмент,

40 (iv)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 33, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 40, або її фрагмент,

(v)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 32, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 39, або її фрагмент,

45 (vi)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 38, або її фрагмент,

(vii)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 41, або її фрагмент,

(viii)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент,  
а  $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 42, або її фрагмент, і

50 (ix)  $V_H$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34, або її фрагмент, а  
 $V_L$  містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 43, або її фрагмент.

У кращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить область  $V_H$ , що включає комплект визначальних комплементарних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраний з наступних варіантів від (i) до (vi):

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

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

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

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

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

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

У кращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить область  $V_L$ , що включає комплект визначальних комплементарність ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з наступних варіантів від (i) до (ix):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

30 У кращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, містить комбінацію  $V_H$  і  $V_L$ , яка включає комплект визначальних комплементарність ділянок CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з наступних втілень від (i) до (ix):

(i)  $V_H$ : CDR1: положення 45-52 в SEQ ID NO: 14, CDR2: положення 70-77 в SEQ ID NO: 14, CDR3: положення 116-125 в SEQ ID NO: 14;  $V_L$ : CDR1: положення 49-53 в SEQ ID NO: 21, CDR2: положення 71-73 в SEQ ID NO: 21, CDR3: положення 110-118 в SEQ ID NO: 21;

35 (ii)  $V_H$ : CDR1: положення 45-52 в SEQ ID NO: 15, CDR2: положення 70-77 в SEQ ID NO: 15, CDR3: положення 116-126 в SEQ ID NO: 15;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 20, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 20, CDR3: положення 115-123 в SEQ ID NO: 20;

(iii)  $V_H$ : CDR1: положення 45-52 в SEQ ID NO: 16, CDR2: положення 70-77 в SEQ ID NO: 16, CDR3: положення 116-124 в SEQ ID NO: 16;  $V_L$ : CDR1: положення 47-52 в SEQ ID NO: 22, CDR2: положення 70-72 в SEQ ID NO: 22, CDR3: положення 109-117 в SEQ ID NO: 22;

40 (iv)  $V_H$ : CDR1: положення 44-51 в SEQ ID NO: 18, CDR2: положення 69-76 в SEQ ID NO: 18, CDR3: положення 115-125 в SEQ ID NO: 18;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 25, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 25, CDR3: положення 115-122 в SEQ ID NO: 25;

(v)  $V_H$ : CDR1: положення 45-52 в SEQ ID NO: 17, CDR2: положення 70-77 в SEQ ID NO: 17, CDR3: положення 116-126 в SEQ ID NO: 17;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 24, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 24, CDR3: положення 115-123 в SEQ ID NO: 24;

45 (vi)  $V_H$ : CDR1: положення 45-53 в SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 в SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 в SEQ ID NO: 19;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 23, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 23, CDR3: положення 115-123 в SEQ ID NO: 23;

50 (vii)  $V_H$ : CDR1: положення 45-53 в SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 в SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 в SEQ ID NO: 19;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 26, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 26, CDR3: положення 115-123 в SEQ ID NO: 26;

(viii)  $V_H$ : CDR1: положення 45-53 в SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 в SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 в SEQ ID NO: 19;  $V_L$ : CDR1: положення 47-58 в SEQ ID NO: 27, CDR2: положення 76-78 в SEQ ID NO: 27, CDR3: положення 115-123 в SEQ ID NO: 27; i

55 (ix)  $V_H$ : CDR1: положення 45-53 в SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 в SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 в SEQ ID NO: 19;  $V_L$ : CDR1: положення 47-52 в SEQ ID NO: 28, CDR2: положення 70-72 в SEQ ID NO: 28, CDR3: положення 109-117 в SEQ ID NO: 28.

60 В інших кращих втіленнях антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано містить одну або кілька ділянок, що визначають комплементарність (CDR), бажано принаймні ділянка CDR3 з варіабельної області важкого ланцюга ( $V_H$ ) і/або варіабельної області легкого

ланцюга ( $V_L$ ) моноклонального антитіла проти CLDN18.2, бажано описаного тут моноклонального антитіла проти CLDN18.2, а бажано воно містить одну або кілька визначальних комплементарність ділянок (CDR), бажано принаймні ділянка CDR3 з описаних тут варіабельних областей важкого ланцюга ( $V_H$ ) і/або варіабельних областей легкого ланцюга ( $V_L$ ). В одному втіленні дані одна або кілька ділянок, що визначають комплементарність (CDR), вибирають із описаного тут комплексу визначальних комплементарність ділянок CDR1, CDR2 і CDR3. В найкращому втіленні антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано містить визначальні комплементарність ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 з варіабельної області важкого ланцюга ( $V_H$ ) і/або варіабельної області легкого ланцюга ( $V_L$ ) моноклонального антитіла проти CLDN18.2, бажано описаного тут моноклонального антитіла проти CLDN18.2, а бажано воно містить визначальні комплементарність ділянки CDR1, CDR2 і CDR3 з описаних тут варіабельних областей важкого ланцюга ( $V_H$ ) і/або варіабельних областей легкого ланцюга ( $V_L$ ).

В одному втіленні антитіло, що містить одну або кілька ділянок CDR, комплект CDR або комбінацію комплектів CDR, як описано тут, містить дані CDRs разом з перемежованими з ними каркасними ділянками. Бажано ця частина також повинна включати щонайменше 50 % однієї з каркасних ділянок - першої та четвертої або обох, причому ці 50 % становлять С-кінцеві 50 % першої каркасної ділянки й N-кінцеві 50 % четвертої каркасної ділянки. Конструювання антитіл методами рекомбінантної ДНК може привести до включення залишків з боку N- або С-кінця у варіабельні області, які кодуються лінкерами, уведеними для полегшення клонування або інших стадій обробки, включаючи введення лінкерів для сполучення варіабельних областей відповідно до винаходу з послідовностями інших білків, у тому числі важких ланцюгів імуноглобулінів, інших варіабельних доменів (наприклад, при одержанні діатілу) або білкових міток.

В одному втіленні антитіло, що містить одну або кілька ділянок CDR, комплект CDR або комбінацію комплектів CDR, як описано тут, містить дані CDRs у каркасі людського антитіла.

Згадування тут антитіл, що містять стосовно свого важкого ланцюга певний ланцюг або певну область або послідовність, бажано відноситься до такої ситуації, коли всі важкі ланцюги даного антитіла містять даний конкретний ланцюг, область або послідовність. Це також відноситься й до легкого ланцюга антитілу, відповідно.

Термін "нуклеїнова кислота" у даному винаході служить для позначення ДНК і РНК. Нуклеїнова кислота може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але бажано це дволанцюгова ДНК.

Відповідно до винаходу, термін "експресія" застосовується в його самому загальному значенні й включає продукцію РНК або РНК і білка/пептиду. Він також включає часткову експресію нуклеїнових кислот. Крім того, експресія може здійснюватися тимчасово або стабільно.

Наведені тут відомості у відношенні певних амінокислотних послідовностей, наприклад, представлених у переліку послідовностей, слід розуміти так, що вони також відносяться й до таких варіантів даних конкретних послідовностей, у яких послідовності функціонально еквівалентні даній конкретній послідовності, наприклад, їхні амінокислотні послідовності проявляють властивості, ідентичні або близькі таким у певних амінокислотних послідовностей. Одним з важливих властивостей є збереження зв'язування антитіла зі своєю мішенню або підтримка ефекторних функцій антитіла. Бажано послідовність, яка є варіантом стосовно певної послідовності, коли вона заміняє цю конкретну послідовність в антитілі, зберігає зв'язування даного антитіла з CLDN18.2 і бажано функції даного антитіла, як описано тут, наприклад, опосередкований CDC лізис або опосередкований ADCC лізис.

Фахівцям повинне бути відомо те, зокрема, що послідовності ділянок CDR, гіперваріабельних і варіабельних областей можна модифікувати без втрати здатності до зв'язування з CLDN18.2. Наприклад, ділянки CDR повинні бути або ідентичними, або сильно гомологічними наведеним тут ділянкам антитілу. Під "високої гомологічністю" мається на увазі те, що в CDR може бути від 1 до 5, бажано від 1 до 4, як то від 1 до 3 або 1 або 2 заміни. Крім того, гіперваріабельні й варіабельні області можна модифікувати так, щоб вони проявляли істотну гомологію з конкретними наведеними тут ділянками антитілу.

У даному винаході "варіанти" амінокислотної послідовності включають варіанти із вставкою амінокислот, варіанти з додаванням амінокислот, варіанти з делецією амінокислот і/або варіанти із заміною амінокислот. Варіанти з делецією амінокислот, що включають делеції на N-кінці й/або С-кінці білка, також називаються N-кінцевими й/або С-кінцевими усіченими варіантами.

Варіанти із вставкою амінокислот включають вставки однієї або двох або декількох амінокислот у певній амінокислотній послідовності. У випадку варіантів амінокислотної послідовності із вставками в певне місце в амінокислотній послідовності вставляється один або кілька амінокислотних залишків, хоча також можливі й випадкові вставки з відповідним

скринінгом отриманого продукту.

Варіанти з додаванням амінокислот включають приєднання по N- і/або C-кінцям однієї або декількох амінокислот, як то 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот.

Варіанти з делецією амінокислот характеризуються видаленням з послідовності однієї або декількох амінокислот, як то видаленням 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот. Делеції можуть бути в будь-якому положенні білка.

Варіанти із заміною амінокислот характеризуються тим, що щонайменше один залишок у послідовності віддаляється, а на його місце вставляється інший залишок. Перевага віддається модифікаціям, що доводяться на такі положення в амінокислотній послідовності, які не зберігаються між гомологічними білками або пептидами, і/або замінам амінокислот на інші з аналогічними властивостями. Бажано заміни амінокислот у білкових варіантах є консервативними замінами, тобто це заміни аналогічних заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативні амінокислотні заміни включають заміни в рамках одного родини амінокислот, подібних по своїх бічних ланцюгах. амінокислоти, що зустрічаються в природі, звичайно підрозділяються на чотири родини: кислі (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан) і незаряджені полярні (гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин) амінокислоти. Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються в сукупності як ароматичні амінокислоти.

Бажано ступінь подібності, бажано ідентичності між даною амінокислотною послідовністю й амінокислотною послідовністю, яка є варіантом даної амінокислотної послідовності, повинна становити щонайменше 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться для амінокислотної ділянки, що становить щонайменше 10 %, щонайменше 20 %, щонайменше 30 %, щонайменше 40 %, щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 90 % або близько 100 % від усієї довжини контрольної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо контрольна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, то ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться щонайменше для 20, щонайменше 40, щонайменше 60, щонайменше 80, щонайменше 100, щонайменше 120, щонайменше 140, щонайменше 160, щонайменше 180 або близько 200 амінокислот, бажано безперервних амінокислот. У кращому втіленні ступінь подібності або ідентичності приводиться для всієї довжини контрольної амінокислотної послідовності. Сполучення послідовностей для визначення подібності, бажано ідентичності послідовностей проводиться за допомогою відомих інструментів, бажано методом найкращого сполучення послідовностей, наприклад, за допомогою Align, використовуючи стандартні настроювання, бажано EMBOSS:needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

“Подібність послідовностей” означає відсоток амінокислот, які або ідентичні, або представляють консервативні заміни амінокислот. “Ідентичність послідовностей” між двома амінокислотними послідовностями означає відсоток амінокислот, ідентичних між цими послідовностями.

Термін “ступінь ідентичності” служить для позначення відсотка ідентичних амінокислотних залишків між двома порівнюваними послідовностями, отриманого після найкращого вирівнювання, причому цей відсоток є чисто статистичним, а відмінності між двома послідовностями розподіляються випадковим чином і по всій довжині. Порівняння послідовностей між двома амінокислотними послідовностями звичайно проводиться шляхом порівняння цих послідовностей після їхнього оптимального вирівнювання, причому таке порівняння проводиться по сегментах або по “вікнах порівняння” з метою виявлення й порівняння локальних ділянок подібності послідовностей. Оптимальне вирівнювання послідовностей для їхнього порівняння може проводитися вручну або ж за допомогою алгоритму локальної гомології Smith and Waterman, 1981, *Ads. App. Math.* 2, 482, за допомогою алгоритму локальної гомології Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, методом пошуку подібності Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444, або за допомогою комп'ютерних програм, у яких використовуються ці алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA, BLASTP, BLASTN і TFASTA у пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Ступінь ідентичності обчислюється шляхом визначення числа ідентичних положень між двома порівнюваними послідовностями, розподілу цієї кількості на число порівнюваних положень і множення отриманого результату на 100, одержуючи відсоток ідентичності між цими двома послідовностями.

Термін “трансгенна тварина” відноситься до таких тварин, у яких геном містить один або

кілька трансгенів, бажано трансгенів важких і/або легких ланцюгів або трансхромосом (вбудованих або не вбудованих у природну геномну ДНК тварини), які бажано здатні експресувати ці трансгени. Наприклад, трансгена миша може містити трансген легкого ланцюга людини й або трансген важкому ланцюга людини, або трансхромосому важкому ланцюга людини, так що миша буде виробляти людські антитіла проти CLDN18.2 при імунізації антигеном CLDN18.2 і/або клітинами, які експресують CLDN18.2. Трансген важкому ланцюга людини може бути вбудований у хромосому ДНК миші, як у випадку трансгенних мишей, наприклад, мишей HumAb, як то мишей Hco7 або Hco12, або ж трансген важкому ланцюга людини може втримуватися поза хромосомами, як у випадку трансхромосомних мишей (наприклад, мишей KM), як описано в WO 02/43478. Такі трансгенні й трансхромосомні миші можуть виробляти трохи ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN18.2 (наприклад, IgG, IgA і/або IgE) шляхом проходження через рекомбінацію V-D-J і перемикання ізотипа.

“Зменшення”, “зниження” або “інгібування” у даному винаході означає загальне зниження або здатність викликати загальне зниження рівня, бажано на 5 % або більше, 10 % або більше, 20 % або більше, краще на 50 % або більше й найбільше бажано на 75 % або більше, наприклад, рівня експресії або рівня проліферації клітин.

Терміни типу “підвищення” або “збільшення” краще означають підвищення або збільшення щонайменше на 10 %, бажано щонайменше на 20 %, бажано щонайменше на 30 %, краще щонайменше на 40 %, краще щонайменше на 50 %, ще краще щонайменше на 80 % і найбільше бажано щонайменше на 100 %, на 200 %, на 500 %, на 1000 %, на 10000 % або ще більше.

#### Механізми дії mAb

Хоча далі представлені міркування щодо механізму, що лежить в основі терапевтичної ефективності антитіл запропонованих винаходом, однак це жодним чином не слід розглядати як обмеження винаходу.

Описані тут антитіла бажано взаємодіють із компонентами імунної системи, бажано через ADCC або CDC. Описані тут антитіла також можуть застосовуватися для спрямованої доставки корисних вантажів (наприклад, радіоіотопів, лікарських препаратів або токсинів) для безпосереднього знищення пухлинних клітин або ж можуть застосовуватися синергично із традиційними хімотерапевтичними засобами, що атакують пухлини через додаткові механізми дії, які можуть включати протипухлинні імунні відповіді, оказавшись порушеними через цитотоксичних побічних ефектів хімотерапевтичних препаратів на Т-Лімфоцити. Однак описані тут антитіла також можуть виявляти дія проста шляхом зв'язування з CLDN18.2 на клітинній поверхні, тим самим, наприклад, блокуючи проліферацію клітин.

#### Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC)

ADCC означає здатність до знищення клітин в ефекторних клітин, як описано тут, зокрема, у лімфоцитів, для чого бажано потрібно, щоб клітини мішені були позначені антитілом.

ADCC бажано відбувається тоді, коли антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних клітинах, а Fc-Домени антитіл задіють Fc-Рецептори (FcγR) на поверхні імунних ефекторних клітин. Ідентифіковано кілька родин Fc-Рецепторів, причому певні популяції клітин експресують характерні для них Fc-Рецептори. ADCC може розглядатися як механізм безпосередньої індукції в різному ступені негайного руйнування пухлини, що приводить до презентації антигену й індукції спрямованих на пухлину і-клітинних відповідей. Бажано індукція ADCC in vivo повинна викликати спрямовані на пухлину і-клітинні відповіді й відповіді антитіл організму.

#### Комплементзалежна цитотоксичність (CDC)

CDC є ще одним методом знищення клітин, який запускається антитілами. Найбільш ефективним ізотипом для активації комплементу є IgM. Також IgG1 і IgG3 обоє дуже ефективно запускають CDC по класичному шляхові активації комплементу. Бажано в цьому каскаді утворення комплексів антиген-антитіло приводить до демаскування декількох найближчих сайтів зв'язування C1q на доменах C2 задіяних молекул антитіл типу молекул IgG (C1q є одним із трьох субкомпонентів комплементу C1). Бажано ці демасковані сайти зв'язування C1q перетворюють колись низкоафінна взаємодія C1q-IgG у взаємодію з високою спорідненістю, яка запускає каскад подій за участю ряду інших білків комплементу й приводить до протеолітичному вивільненню хемотаксичних, що активують ефекторні клітини молекул C3a й C5a. Бажано каскад комплементу закінчується утвором мембраноатакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, що сприяють вільному проходженню води й розчинених речовин у клітину й із клітини.

#### Одержання й тестування антитіл

Описані тут антитіла можуть бути отримані різними способами, включаючи стандартні методи моноклональних антитіл, наприклад, стандартний метод гібридизації соматичних клітин

Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хоча методи гібридизації соматичних клітин і кращі, однак у принципі можна використовувати й інші методи одержання моноклональних антитіл, наприклад, вірусної або онкогенної трансформації В-лімфоцитів або методи фагового дисплея з використанням бібліотек генів антитіл.

5 Кращою тваринною системою для одержання гібридом, секретуючих моноклональні антитіла, є мишача система. Одержання гібридом на мишах є дуже добре розробленою процедурою. Відомі методики імунізації й методи виділення імунізованих спленоцитів для злиття. Також відомі партнери для злиття (наприклад, міеломні клітини миші) і процедури злиття.

10 Іншими кращими системами на тварин для одержання гібридом, секретуючих моноклональні антитіла, є системи на пацюках і кроликах (наприклад, описані в Spieker-Polet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9348 (1995), також див. Rossi et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 124: 295 (2005)).

15 У ще одному кращому втіленні моноклональні антитіла людини можуть бути отримані з використанням трансгенних або трансхромосомних мишей, що несуть частини імунної системи людини, а не системи миші. Ці трансгенні й трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HumAb і KM миші, відповідно, і собирательно іменуються тут як "трансгенні миші". Одержання людських антитіл у таких трансгенних мишах може проводитися, як описано докладно для CD20 в WO 2004/035607.

20 Ще одна стратегія для одержання моноклональних антитіл полягає в тому, щоб безпосередньо виділити гени, що кодують антитіла, з лімфоцитів, що виробляють антитіла певної специфічності, наприклад, див., Babcock et al., 1996: A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Докладно про конструювання рекомбінантних антитіл див. також Welschof and Kraus, *Recombinant antibodies for cancer therapy*: ISBN-0-89603-918-8; і Benny K.C. Lo, *Antibody Engineering*: ISBN 1-58829-092-1.

25 Для одержання антитіл можна імунізувати мишей кон'югованими з носіями пептидами, отриманими з послідовності антигену, тобто послідовності, проти якої повинні бути спрямовані антитіла, збагаченим препаратом рекомбінантно експресованого антигену або його фрагментів і/або клітинами, які експресують антиген, як описано. З іншого боку, можна імунізувати мишей ДНК, що кодує антиген або його фрагменти. У тому випадку, коли імунізація очищеним або збагаченим препаратом антигену не приводить до утворення антитіл, мишей також можна імунізувати клітинами, які експресують антиген, наприклад, клітинної лінії, щоб підсилити імунні відповіді.

35 Імунна відповідь можна відслідковувати по ходу імунізації за допомогою зразків плазми й сироватки, отриманих із хвостової вени або заочноямкових проб крові. Мишей з достатнім титром імуноглобуліну можна використовувати для злиття. Для підвищення відсотка гібридом, секретуючих певне антитіло, мишей можна ревакцинувати внутрішньоочеревинно або внутрішньовенно клітинами, які експресують антиген, за 3 доби до забою й видалення селезінки.

40 Для одержання гібридом, які продукують моноклональні антитіла, можна виділити спленоцити й клітини лімфатичних вузлів з імунізованих мишей і злити їх з відповідної іморталізованою лінією клітин типу лінії клітин міеломи миші. Отримані гібридами можна потім піддати скринінгу на вироблення антиген-специфічних антитіл. Потім можна провести скринінг індивідуальних комірок методом ELISA на предмет гібридом, які секретують антитіла.

45 Використовуючи клітини, які експресують антиген, можна ідентифікувати антитіла зі специфічністю до антигену по імуофлуоресценції й методом FACS. Секретуючі антитіла гібридами можна пересіяти, знову провести скринінг і, якщо вони як і раніше будуть позитивними на наявність моноклональних антитіл, субклонировать методом серійних розведень. Потім можна культивувати стабільні субклони *in vitro*, щоб одержати антитіла в середовищі для культури тканини для вивчення.

50 Антитіла також можна одержати в клітинах трансфектоми, наприклад, комбінацією методів рекомбінантної ДНК і методів генної трансфекції, які добре відомі в даній області (Morrison S. (1985) *Science* 229: 1202).

55 Наприклад, в одному втіленні, потрібні гени, наприклад, гени антитіла, можна лігувати в експресійний вектор типу експресуючої плазмиди для еукаріот типу тїєї, що використовується в системі експресії генів GS, розкритої в WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або іншої системи експресії, добре відомої в даній галузі. Очищену плазмиду із клонованими генами антитіла можна ввести в еукаріотичні клітини хазяїна, як то клітини CHO, клітини NS/0, клітини HEK293T або клітини HEK293 або ж в інші еукаріотичні клітини типу рослинних клітин, грибкових

60

або дріжджових клітин. Для введення цих генів можна використовувати вже описані методи, такі як електропорація, ліпофекція, ліпофектамін або інші. Після введення цих генів антитіла в клітини хазяїна можна ідентифікувати й відібрати клітини, які експресують антитіло. Ці клітини є трансфектами, які можна потім розмножити до потрібного рівня експресії й одержання антитіл.

З іншого боку, клоновані гени антитіла можна експресувати в інших системах експресії, включаючи прокариотичні клітини типу мікроорганізмів, наприклад, *E. coli*. Більше того, антитіла можна одержувати й у трансгенних тварин, наприклад, у молоці з овець і кроликів або в яйцях з курей, або в трансгенних рослинах; наприклад, див. Verma R. et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; i Fischer R. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 380: 825-839.

#### Химеризація

Мишачі моноклональні антитіла можна використовувати як терапевтичні антитіла для людини, якщо позначити їх токсинами або радіоактивними ізотопами. Немічені мишачі антитіла є сильно імуногенними для людини, що при повторному застосуванні веде до зниження терапевтичного ефекту. В основному імуногенність опосередкована константними областями важкого ланцюга. Імуногенність мишачих антитіл для людини можна зменшити або повністю усунути, якщо відповідні антитіла піддати химеризації або гуманізації. Химерні антитіла - це такі антитіла, різні частини яких походять від різних видів тварин, як то варіабельна область походить із антитіла миші, а константна область - з імуноглобуліну людини. Химеризація антитіл здійснюється шляхом приєднання варіабельних областей важкому й легкому ланцюгу мишачого антитіла до константної області важкого й легкого ланцюга людини (наприклад, як описано Kraus et al., in *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). У кращому втіленні химерні антитіла одержують шляхом сполуки константної області легкої каппа-ланцюги людини з варіабельною областю легкого ланцюга миші. В іншому кращому втіленні химерні антитіла можна одержати шляхом поєднання константної області легкого лямбда-ланцюга людини з варіабельною областю легкого ланцюга миші. Для одержання химерних антитіл кращі константні області важкого ланцюга типу IgG1, IgG3 i IgG4. Інші кращі константні області важкого ланцюга для одержання химерних антитіл - IgG2, IgA, IgD i IgM.

#### Гуманізація

Антитіла взаємодіють із антигенами мішені бажано через ті амінокислотні залишки, які перебувають у шести визначальних комплементарних ділянках (CDR) важкому й легкому ланцюгу. Із цієї причини амінокислотні послідовності в межах CDR більш різноманітні між окремими антитілами, чому послідовності поза CDR. Оскільки послідовності CDR відповідальні за більшу частину взаємодії антитіло-антиген, те можна експресувати рекомбінантні антитіла, що імітують властивості певних природних антитіл, шляхом конструювання які експресують векторів, що включають послідовності CDR з даного природного антитіла, привиті на каркасні послідовності з іншого антитіла з іншими властивостями (наприклад, див. Riechmann L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; i Queen C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033). Такі каркасні послідовності можна одержати із загальнодоступних баз даних по ДНК послідовності, що містять, генів антитіл зародкової лінії. Ці послідовності зародкової лінії будуть відрізнятися від зрілих послідовностей генів антитіл, тому що вони не включають повністю зібрані гени варіабельної області, які утворюються при з'єднанні V-(D)-J у процесі дозрівання В-клітин. Послідовності зародкової лінії генів також відрізняються від послідовностей антитіл з високою спорідненістю із вторинного репертуару за окремими точками рівномірно по всій варіабельній області.

Здатність антитіл до зв'язування з антигеном можна визначити стандартними методами аналізу зв'язування (наприклад, методами ELISA, Вестерн-Блот, імунофлуоресценції й проточної цитометрії).

Для очищення антитіл можна вирощувати відібрані гібридами у дволітрових обертових колбах для очищення моноклональних антитіл. З іншого боку, антитіла можна одержувати в діалізних біореакторах. Супернатанти фільтрують, а при необхідності й концентрують перед проведенням афінної хроматографії на сефарозі з білком G або сефарозі з білком A. Елюований IgG піддають перевірці на чистоту методами гель-електрофореза й високоефективної рідинної хроматографії. Буферний розчин міняють на PBS, а концентрацію визначають по OD<sub>280</sub>, використовуючи коефіцієнт екстинкції 1,43. Моноклональні антитіла розділяють на порції й зберігають при -80 °C.

Щоб визначити, чи зв'язуються обрані моноклональні антитіла з унікальними епітопами, можна використовувати сайт-спрямований або множинний сайт-спрямований мутагенез.



Для визначення ізотипа антитіл можна провести ELISA на ізотип за допомогою різних комерційних наборів (наприклад, Zymed, Roche Diagnostics). Комірочки мікропланшета покривають антитілом проти Ig миші. Після блокування планшет піддають реакції з моноклональними антитілами або очищеними контролями на ізотип, за кімнатної температури протягом двох

5 годин. Потім комірки піддають реакції з кон'югованими з пероксидазою зондами, специфічними до IgG1, IgG2a, IgG2b або IgG3 миші, IgA або IgM миші. Після відмивання планшет проявляють за допомогою субстрату ABTS (1 мг/мл) і аналізують по OD<sub>405-650</sub>. З іншого боку, можна використовувати набір Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, кат. № 1493027), як описано виробником.

10 Для того, щоб показати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати проточну цитометрію. Клітинні лінії, які експресують антиген природно або після трансфекції, і негативні контролі, не які експресують антиген (вирощені в стандартних умовах росту), змішують із різними концентраціями моноклональних антитіл у супернатантах гібридом або в

15 PBS, що містить 1 % FBS, і інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Після відмивання проводять зв'язування мічених Arc або Alexa647 антитіл проти IgG з, що зв'язався з антигеном моноклональним антитілом у такі ж умовах, як і при зв'язуванні первинного антитіла. Зразки аналізують методом проточної цитометрії на приладі FACS з настроюванням каналу на

20 одиночні живі клітини по властивостях прямого й бічного світлорозсіювання. Для того, щоб відрізнити антиген-специфічні моноклональні антитіла від неспецифічного зв'язування при одиничному вимірі, можна використовувати метод котрансфекції. Клітини, що пройшли тимчасову трансфекцію плазмідами, що кодуєть антиген і флуоресцентний маркер, піддають фарбуванню, як описано вище. Трансфіковані клітини детектують на іншому каналі флуоресценції, ніж пофарбовані антитілом клітини. Оскільки більшість трансфікованих клітин експресують обидва трансгени, те антиген-специфічні моноклональні антитіла бажано

25 зв'язуються із клітинами, які експресують флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються в співрозмірному співвідношенні з не-трансфікованими клітинами. Поряд з методом проточної цитометрії або замість нього можна використовувати альтернативний метод з використанням флуоресцентної мікроскопії. Клітини піддають фарбуванню точно так само, як

30 описано вище, і аналізують за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Для того, щоб показати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати метод імунофлуоресцентної мікроскопії. Наприклад, лінії клітин, які експресують антиген спонтанно або після трансфекції, і негативні контролі, не які експресують антиген, культивують

35 на предметних скельцях з комірками в стандартних умовах росту в середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FCS), 2 мМ L-глутаміну, 100 МО/мл пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Потім клітини фіксують у метанолі або параформальдегіді або залишають необробленими. Потім клітини піддають реакції з моноклональними антитілами проти антигену протягом 30 хв. при 25 °C. Після відмивання

40 клітини піддають реакції з міченим Alexa555 вторинним антитілом проти IgG миші (Molecular Probes) за тих же умов. Потім клітини досліджують методом флуоресцентної мікроскопії.

Можна приготувати клітинні екстракти із клітин, які експресують антиген і відповідних негативних контролів, і піддати їх електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS). Після електрофорезу розділені антигени переносять на нітроцелюлозні

45 мембрани, блокують і зондують моноклональними антитілами, що підлягають тестуванню. Зв'язування з IgG детектують за допомогою кон'югованого з пероксидазою антитіла проти IgG миші й проявляють за допомогою субстрату ECL.

Антитіла також можна тестувати на реактивність із антигеном методом імуногістохімії, добре відомим фахівцям, наприклад, використовуючи фіксовані параформальдегідом або ацетоном криосрези або ув'язнені в парафін і фіксовані параформальдегідом зрізи тканин зі зразків

50 неракової тканини або ракової тканини, отриманих від пацієнтів при рутинних хірургічних процедурах або з мишей, що несуть привиті пухлини із клітинних ліній, які експресують антиген спонтанно або після трансфекції. Для імуноокрашення їх інкубують з реагуючими з антигеном антитілами, а потім з кон'югованими з пероксидазою хрину козячими антитілами проти миші або

55 козячими антитілами проти кролика (DAKO) відповідно до інструкцій виробника.

Антитіла можна протестувати на їхню здатність опосередковувати фагоцитоз і знищення клітин, які експресують CLDN18.2. Тестування активності моноклональних антитіл *in vitro* забезпечує первісний скринінг перед тестуванням на моделях *in vivo*.

Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC)

60 Коротко, поліморфноядерні клітини (PMNs), NK-клітини, моноцити, мононуклеари або інші

ефекторні клітини від здорових донорів піддають очищенню за допомогою центрифугування в градієнті щільності Ficoll Нугауе з наступним лізисом сумішей еритроцитів. Промиті ефекторні клітини суспендують у середовищі RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки або 5 % інактивованої нагріванням людської сироватки й змішують із міченими  $^{51}\text{Cr}$  клітинами мішені, які експресують CLDN18.2, при різних співвідношеннях ефекторних клітин і клітин мішені. Як альтернативи клітини мішені можна позначити посилюючим флуоресценцію лігандом (BATDA). Сильно флуоресціюючий хелат європію посилюють лігандом, який вивільняється з мертвих клітин, вимірюють на флуориметрі. В іншому альтернативному методі застосовується трансфекція клітин мішені люциферазою. При додаванні Lucifer Yellow він може бути окиснений тільки життєздатними клітинами. Потім додають очищений IgG проти CLDN18.2 у різних концентраціях. Як негативний контроль використовують сторонній IgG людини. Аналізи проводяться протягом 4-20 годин при 37 °C залежно від типу використовуваних ефекторних клітин. Зразки досліджують на цитоліз по вимірюванням вивільнення  $^{51}\text{Cr}$  або присутності хелата Eutda у супернатанті культури. З іншого боку, заходом життєздатних клітин може служити люмінесценція в результаті окиснення Lucifer Yellow.

Моноклональні антитіла проти CLDN18.2 також можна протестувати в різних комбінаціях, щоб визначити, чи буде підсилюватися цитоліз при декількох моноклональних антитілах.

Комплементзалежна цитотоксичність (CDC)

Моноклональні антитіла проти CLDN18.2 можна протестувати на їхню здатність опосередковувати CDC різними відомими методами. Наприклад, можна одержати сироватку для комплементу із крові відомим фахівцям способом. Для визначення CDC-активності mAbs можна використовувати різні методи. Наприклад, можна вимірювати вивільнення  $^{51}\text{Cr}$  або підвищення проникності мембрани методом аналізу виключення пропідію йодиду (PI). Коротко, клітини мішені промивають і інкубують при  $5 \times 10^5/\text{мл}$  з різними концентраціями mAb протягом 10-30 хв. за кімнатної температури або при 37 °C. Потім додають сироватку або плазму до кінцевої концентрації 20 % (об./об.) і інкубують клітини при 37 °C протягом 20-30 хв. Усі клітини з кожного зразка вносять у розчин PI у пробірці для FACS. Потім суміш відразу ж піддають аналізу методом проточної цитометрії з використанням FACSArray.

В альтернативному методі визначається індукція CDC на адгезивних клітинах. В одному втіленні цього методу клітини висівають за 24 год. до аналізу при  $3 \times 10^4/\text{комірку}$  в плоскодонні мікропланшети для тканинних культур. Наступного дня середовище росту видаляють, а клітини інкубують у трьох повторях з антитілами. Контрольні клітини інкубують у середовищі росту або ростовому середовищі, що містить 0,2 % сапоніну, для визначення фонового лізису й максимального лізису, відповідно. Після інкубації 20 хв. за кімнатної температури супернатант видаляють, а до клітин додають 20 % (об./об.) плазми або сироватки людини в DMEM (нагрітої до 37 °C) та інкубують ще 20 хв. при 37 °C. Усі клітини з кожного зразка вносять у розчин пропідію йодиду (10 мкг/мл). Потім супернатанти заміняють на PBS, що містить 2,5 мкг/мл етидію броміду, і вимірюють флуоресценцію при 600 нм із порушенням при 520 нм на приладі Tecan Safire. Специфічний лізис у відсотках розраховують у такий спосіб: специфічний лізис (%) = (флуоресценція зразка - фонова флуоресценція)/(флуоресценція при максимальному лізисі - фонова флуоресценція)  $\times 100$ .

Індукція апоптозу й інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами

Для тестування на здатність запускати апоптоз моноклональні антитіла проти CLDN18.2 можна, наприклад, інкубувати із CLDN18.2-позитивними раковими клітинами, наприклад, трансфікованими CLDN18.2 раковими клітинами SNU-16, DANG або KATO-III, при 37 °C протягом зразкових 20 годин. Клітини збирають, промивають у буфері для зв'язування з Annexin-V (BD Biosciences) і інкубують з Annexin V, кон'югованим з FITC або APC (BD Biosciences), протягом 15 хв. у темряві. Усі клітини з кожного зразка вносять у розчин PI (10 мкг/мл в PBS) у пробірці для FACS і відразу ж оцінюють методом проточної цитометрії (як описано вище). З іншого боку, можна детектувати загальне інгібування проліферації клітин моноклональними антитілами за допомогою комерційно доступних наборів. Набір DELFIA Cell Proliferation Kit (Perkin-Elmer, кат. № AD0200) є неізотопний імуноаналіз на основі вимірювання включення 5-бром-2'-дезоксидуридину (BrdU) під час синтезу ДНК у проліферуючих клітинах на мікропланшетах. Включення BrdU визначається за допомогою мічених європієм моноклональних антитіл. Для детектування антитіл клітини фіксують і денатурують ДНК за допомогою розчину Fix. Незв'язані антитіла вимиваються й додається DELFIA Inducer, який витісняє іони європію з міченого антитіла в розчин, де вони утворюють сильнофлуоресціюючі хелати з компонентами DELFIA Inducer. Вимірюють флуоресценцію методом флуориметрії з розрізненням часу, яке пропорційне до синтезу ДНК у клітинах за кожною лункою.

## Доклінічні дослідження

Моноклональні антитіла, які зв'язуються з CLDN18.2, також можна протестувати на моделі *in vivo* (наприклад, на імунodefіцитних мишах, що несуть привіт пухлини із клітинних ліній, які експресують CLDN18.2, наприклад, DANG, SNU-16 або KATO-III, або після трансфекції, наприклад, HEK293), щоб визначити їхню ефективність у контролюванні росту пухлинних клітин, які експресують CLDN18.2.

Дослідження *in vivo* після ксенотрансплантації які експресують CLDN18.2 пухлинних клітин мишам або іншим тваринам з ослабленим імунітетом можуть проводитися з використанням описаних тут антитіл. Антитіла можна вводити позбавленим пухлин мишам з наступним введенням пухлинних клітин, щоб виміряти ефекти антитіл у запобіганні утворення пухлин або пов'язаних з ними симптомів. Антитіла можна вводити несучим пухлини мишам, щоб визначити терапевтичну ефективність відповідних антитіл у зменшенні росту, утворення метастаз пухлин або пов'язаних з ними симптомів. Застосування антитіл можна поєднувати із застосуванням інших речовин типу цитостатичних препаратів, інгібіторів факторів росту, блокувальних клітинного циклу, інгібіторів ангиогенеза або інших антитіл, щоб визначити синергійну ефективність і потенційну токсичність комбінацій. Для аналізу токсичних побічних ефектів, опосередкованих антитілами, можна інокулювати тваринам антитіла або контрольні реагенти й ретельно досліджувати на наявність симптомів, можливо пов'язаних з терапією антитілами до CLDN18.2. Можливі побічні ефекти застосування *in vivo* антитіл до CLDN18.2 включають, зокрема, токсичність в тканинах, які експресують CLDN18.2, включаючи шлунок. Антитіла, що розпізнають CLDN18.2 у людини й інших видів, наприклад, миші, особливо полезні для прогнозування можливих побічних ефектів, опосередкованих застосуванням моноклональних антитіл до CLDN18.2 на людях.

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

Описані тут сполуки й засоби можна вводити у вигляді будь-якої придатної фармацевтичної композиції.

Фармацевтичні композиції звичайно представлені в стандартній дозовій формі й можуть бути отримані відомими *per se* способами. Фармацевтичні композиції, наприклад, можуть бути у вигляді розчину або суспензії.

Фармацевтичні композиції можуть містити солі, буферні речовини, консерванти, носії, розріджувачі й/або наповнювачі, які всі бажано є фармацевтично прийнятними. Термін "фармацевтично прийнятний" означає відсутність токсичності в матеріалі, який не впливає на дію активного компонента фармацевтичної композиції.

Солі, які не є фармацевтично прийнятними, можуть застосовуватися для одержання фармацевтично прийнятних солей і включені у винахід. Фармацевтично прийнятні солі такого типу включають, без обмеження, солі, отримані з наступних кислот: соляної, бромистоводневої, сірчаної, азотної, фосфорної, малеїнової, оцтової, саліцилової, лимонної, мурашиної, маленової, бурштинової кислоти й ін. Фармацевтично прийнятні солі також можуть бути отримані у вигляді солей лужних металів або солей лужноземельних металів, як то солей натрію, солей калію або солей кальцію.

Придатні буферні речовини для застосування у фармацевтичних композиціях включають оцтову кислоту у вигляді солі, лимонну кислоту у вигляді солі, борну кислоту у вигляді солі й фосфорну кислоту у вигляді солі.

Придатними консервантами для застосування у фармацевтичних композиціях є бензалконію хлорид, парабен, хлорбутанол і тимеросал.

Форми для ін'єкцій можуть містити фармацевтично прийнятні наповнювачі типу лактата для Рінгера.

Термін "носій" відноситься до таких органічних або неорганічних компонентів, природного або синтетичного походження, з якими сполучається активний компонент для того, щоб полегшити, підсилити або уможливити застосування. Відповідно до винаходу, термін "носій" також включає один або кілька сумісних твердих або рідких наповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючих речовин, придатних для введення пацієнтам.

Можливими речовинами-носіями для парентерального введення є, наприклад, стерильна вода, розчин Рінгера, розчин Рінгера з лактатом, стерильний розчин хлориду натрію, поліалкіленгліколі, гідрогенізовані нафталіни й особливо біосумісні полімери лактидів, співполімери лактидів/гліколідів або співполімери поліоксиетилена/поліоксипропілена.

Термін "наповнювач" у даному винаході служить для позначення всіх речовин, які можуть

бути присутніми у фармацевтичній композиції, але не є активними інгредієнтами, таких, наприклад, як носії, зв'язувальні речовини, що змазують речовини, загущувачі, поверхнево-активні речовини, консерванти, емульгатори, буфери, ароматизатори або барвники.

Описані тут засоби й композиції можуть вводитися будь-яким стандартним способом, як то за допомогою парентерального введення, у тому числі за допомогою ін'єкцій або інфузій. Кращим є парентеральне введення, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, підшкірно, внутрішньошкірно або внутрішньом'язово.

Композиції, що підходять для парентерального введення, звичайно містять стерильний водний або неводний препарат активної сполуки, який бажано є ізотонічним для крові реципієнта. Прикладами сумісних носіїв і розчинників служать розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як середовища для розчинів або суспензій використовують нелетучі масла, звичайно стерильні.

Описані тут засоби й композиції вводяться в ефективних кількостях. Термін "ефективна кількість" означає таку кількість, яка викликає потрібну реакцію або необхідний ефект сама окремо або разом з наступними дозами. У випадку лікування певного захворювання або стану бажана реакція переважно означає уповільнення розвитку захворювання. Це включає уповільнення розвитку захворювання, зокрема, припинення або зворотне прогресування захворювання. При лікуванні захворювання або стану бажаною реакцією може бути затримка виникнення або запобігання виникнення даного захворювання або стану.

Ефективна кількість описаного тут засобу або композиції буде залежати від типу захворювання, яке потрібно лікувати, ступеню тяжкості захворювання, індивідуальних параметрів пацієнта, таких як вік, фізіологічний стан, розмір і вага, тривалості лікування, типу попутної терапії (якщо вона є), конкретного способу введення й подібних факторів. Відповідно, дози описаних тут засобів, які вводяться, можуть залежати від цих різних параметрів. У випадку, коли реакція пацієнта недостатня при початковій дозі, можна застосовувати більш високі дози (або ефективно більш високі дози, що досягаються іншим, більш локалізованим способом введення).

Описані тут засоби й композиції можна вводити пацієнтам, наприклад, *in vivo*, для лікування або профілактики різних захворювань типу тих, що описані тут. Кращими пацієнтами є хворі люди з такими захворюваннями, які можуть бути виправлені або полегшені при введенні описаних тут засобів і композицій. Це включає захворювання за участю клітин, що характеризуються зміною профілю експресії CLDN18.2.

Наприклад, в одному втіленні описані тут антитіла можуть застосовуватися для лікування хворих на ракові захворювання, наприклад, ракові захворювання типу описаних тут, які характеризуються наявністю ракових клітин, які експресують CLDN18.2.

Фармацевтичні композиції й способи лікування, описані відповідно до винаходу, також можуть застосовуватися при імунізації або вакцинації для запобігання описаних тут захворювань.

Далі даний винахід розкривається на наступних прикладах, які не повинні сприйматися як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1. Матеріали й методи

1. Антитіла

Таблиця 1

## Використані антитіла

Антитіло	Постачальник (кат. №)	Мішень	Сайт зв'язування	Клональність	Вид	Застосу- вання
IMAB362	Ganymed	CLDN18.2	N-кінець	моноклон.	химера	ADCC, CDC, IF
проти клаудину 18 (Mid)	Zymed #38- 8100	CLDN18.1 CLDN18.2	C-кінець а.к. 220-246	поліклон.	кролик	IF, IHC
проти клаудину 18 (C-кінець)	Zymed #38- 800	CLDN18.1 CLDN18.2	C-кінець а.к. 240-262	поліклон.	кролик	WB
43-14A	Ganymed	CLDN18.2	C-кінець а.к. 248-262	моноклон.	миша	IHC
35-22A	Ganymed	CLDN18.2	C-кінець а.к. 248-262	моноклон.	миша	IF, IHC
проти EPR1394Y людини	Antibody online	МНС-I людини	-	моноклон.	кролик	IHC
проти $\beta$ -актину	Sigma	актин	-	моноклон.	миша	WB

## 2. Імуногістохімія (IHC)

Зрізи тканин (товщиною 4 мкм) зберігали при 2-8 °С до використання.

- 5 Перед процесом депарафінізації зрізи інкубували при 58-60 °С у сушильній шафі протягом 1 години, щоб розплавити парафін і кількісно вилучити воду, тим самим поліпшуючи адгезію тканин до скелець ("пропікання").

## Депарафінізація

- 10 Після розплавлювання й висушування скло піддавали депарафінізації ксилолом у дві стадії (по 5 хв.) і регідратації з використанням спадаючого ряду розчинів спирту (за температури навколишнього середовища 20-27 °С):

- 5 ( $\pm$ 1) хв. у ксиоловій ванні;
- ще раз у свіжій ксиоловій ванні;
- вилучити зайву рідину;
- 15 • 5 ( $\pm$ 1) хв. в абсолютному етанолі;
- ще раз у свіжій ванні;
- вилучити зайву рідину;
- 5 ( $\pm$ 1) хв. в 96 % етанолі;
- ще раз у свіжій ванні;
- 20 • вилучити зайву рідину;
- 5 ( $\pm$ 1) хв. в 80 % етанолі;
- вилучити зайву рідину;
- 5 ( $\pm$ 1) хв. в 70 % етанолі;
- вилучити зайву рідину;
- 25 • 5 хв. у дистильованій або деіонізованій воді.

## Відтворення епітопів і гасіння

- 30 Після видалення парафіну проводили видалення епітопів мішені за методикою термоіндукованого видалення епітопів. Для цього скельця поміщали в посуд для фарбування, заповнений 200 мл буфера для відтворення (10 мМ цитратний буфер, 0,05 % Tween-20, pH 6), і інкубували в скороварці (PASCAL, Dako) при 120 °С протягом 10 хв. Після цього посуд виймали зі скороварки й залишали охолоджуватися в розчині для відтворення епітопів на 10 ( $\pm$ 1) хв. за кімнатної температури. Скло промивали промивним буфером (1×PBS).

- 35 Після охолодження зрізи поміщали в посуд для фарбування, заповнений 200 мл розчину, що гасить (0,3 % пероксидази в 1×PBS), і інкубували 15 хв. за кімнатної температури, а потім промивали 2×5 хв. свіжим промивним буфером.

## Блокування й інкубація антитіл

- 40 Видаляли надлишок промивного буфера, покривали скельця 200 мкл блокувального буфера (10 % козячої сироватки в 1×PBS) і інкубували за кімнатної температури протягом 30 хв. Блокувальний буфер видаляли й заміняли на 200 мкл розведеного розчину антитіла (розведення в блокувальному буфері). Предметні скельця інкубували з первинним антитілом протягом ночі при 2-8 °С:

Таблиця 2

Розведення первинних антитіл для гістології - вихідна й кінцева концентрація антитіл, які використовуються при гістологічному аналізі

Розведення первинних антитіл					
Антитіло	вихідна конц.	підтип	епітоп	послідовність епітопа	кінцева конц.
mumAb 43-14A	1 мг/мл	IgG2b	CLDN18 C-кінець	TEDEVQSYPKHDYV	0,5 мкг/мл
mumAb 35-22A	1 мг/мл	IgG2b	CLDN18 C-кінець	TEDEVQSYPKHDYV	0,2 мкг/мл

Наступного дня видаляли розчин первинного антитіла й промивали зрізи 3×5 хв. промивним буфером. Після цього надлишок промивного буфера видаляли й додавали 200 мкл готового до використання розчину вторинного антитіла (Power Vision козяче-проти-миші з HRP; Immunologic, NL). Предметні скельця інкубували 30 хв. за кімнатної температури. Надлишок рідини видаляли, а скельця промивали 3×5 хв. свіжим промивним буфером.

Реакція із субстратом і контрастне фарбування

Після видалення надлишку промивного буфера зрізи покривали біля 50-150 мкл свіжоприготовленого розчину субстрату-хромогену (Vectorred; Vector Labs) протягом 2 хв. Надлишок субстрату видаляли, а предметні скельця інкубували в посудинах з деіонізованою водою протягом 1-5 хв.

Після цього проводили контрастне фарбування зануренням зрізів у судини, що містять по 200 мл гематоксиліну Mayer, на 2 хв. Після цього зрізи поміщали у водопровідну воду на 5-10 хв. для підсинювання ядер.

Зневоднювання й фіксація препаратів

Після контрастного фарбування зрізи збезводнювали за допомогою зростаючого ряду розчинів спирту:

- занурення в 70 %-й етанол (на 5-10 с);
- занурення в 80 %-й етанол (на 5-10 с);
- занурення в 96 %-й етанол (на 5-10 с);
- занурення в 96 %-й етанол (на 5-10 с);
- занурення в абсолютний етанол (на 5-10 с);
- 5 хв. у ксилолі;
- 5 хв. у ксилолі.

Для фіксації препаратів використовували неводне заливне середовище (X-TRA-Kit, Medite). Предметні скельця заливали прямо відразу після останнього заповненого ксилолом посудини й сушили на повітрі за кімнатної температури.

Таблиця 3

Мікроматриці тканин для гістологічного аналізу

Мікроматриця	Постачальник	Кіл-ть зразків	Кіл-ть проб	Розмір проб	Товщина
PA961; карцинома підшлункової залози й нормальні тканини	Biocat	96	96	1,5 мм	5 мкм
PA802; множинні тканини карциноми підшлункової залози, по 1 пробі на зразок	Biocat	78	80	1,5 мм	5 мкм
BIC14011; неоплазії інтраепітеліальної тканини підшлункової залози	Biocat	24	48	1,5 мм	5 мкм

### 3. Культивування клітин

Усі ракові лінії клітин підшлункової залози й додаткові контрольні лінії клітин, що використовувалися для представлених тут експериментів, культивували в середовищах згідно з вихідними специфікаціями й відповідно до стандартних методик для тканинних культур. Умови наведено в таблиці 4. Для всіх знову отриманих клітинних ліній перевіряли клітини на забруднення мікоплазмою й готували майстер-банк клітин.

Таблиця 4

Умови культивування для ракових ліній клітин підшлункової залози й контрольних клітин

Клітинна лінія <sup>1</sup>	Колби/чашки	Середовище	Інкубація	Щільність посіву	
				2 дня <sup>2</sup>	3 дня <sup>2</sup>
AsPC-1	T150	RPMI + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
BxPC3 (ATCC)	T150	RPMI + 10 мМ HEPES+1 мМ пірувата натрію+4,5 г/л глюкози (всього) + 10 % FCS Gold	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	7×10 <sup>6</sup>
BxPC3-LVT (ECACC)	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1 мМ пірувата натрію+ 1× бікарбонат натрію + 4,5 г/л глюкози + 10 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 0,5 мкг/мл (свіжий) бластицидін	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
BxPC3-LVT-luciferase	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1мМ піруват натрію+ 1х бікарбонат натрію + 4,5 г/л глюкози + 10 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 0,5 мкг/мл бластицидін (свіжий) + 40 мкг/мл гігромаїцину (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
CAPAN1	T150	RPMI + 20 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	8×10 <sup>6</sup>
CAPAN1-LVT	T150	RPMI + 20 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 2,5 мкг/мл бластицидін (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
CAPAN1-LVT	T150	RPMI + 20 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 2,5 мкг/мл бластицидін (свіжий) + 40 мкг/мл гігромаїцину	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
CHO-K1p740 MACS/FACS (24H5) Luci#2A5	15 див	DMEM:F12 + 1 % пен./стрепт. + 10 % FCS + 1,5 мг/мл генетицину (G-418)	7,5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,6×10 <sup>6</sup>	7×10 <sup>5</sup>
CFPAC-1	T150	Iscove's MDM + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	5×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>6</sup>
DANG 1C5F2	15 див	RPMI + 1 % пен./стрепт. + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	4×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>6</sup>
DANG 1C5F2 LVT	15 див	RPMI + 1 % пен./стрепт. + 10 % FCS + 1 мкг/мл бластицидін (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	4×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>6</sup>
НЕК293p740 #A5	15 див	DMEM:F12 + 1 % пен./стрепт. + 10 % FCS + 1,5мг/мл генетицину (G-418)	7,5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>
HPAC	T150	DMEM:F12 +15 мМ HEPES + 0,002 мг/мл інсуліну човече ка + 10 нг/мл EGF + 5 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
HPAC-LVT	T150	DMEM:F12 +15 мМ HEPES + 0,002 мг/мл інсуліну човече ка + 10 нг/мл EGF + 5 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 3,5 мкг/мл бластицидін (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
HPAF-II	T150	MEM + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	5×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>
HUP-T3	T150	MEM + 1× MEM NEAA + 1 мМ пірувата натрію + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>6</sup>
HUP-T4	T150	MEM + 1× MEM NEAA + 1 мМ пірувата натрію + 20 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>

Продовження Таблиці 4

KATO-III FGF-BP #12 adm <sup>3</sup>	T150	RPMI + 1 % пен./стрепт. + 4 мМ glutamax (усього) + 20 % FCS	7,5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>
KP-2	T150	RPMI + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	6×10 <sup>6</sup>
MiaPaCa-2	T150	MEM + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
MiaPaCa-2- LVT	T150	MEM + 10 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 1,5 мкг/мл бластицидину	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1×10 <sup>7</sup>	8×10 <sup>6</sup>
NUGC-4 sub10ch11 sube10 Luci#2	T150	RPMI + 1 % пен./стрепт. + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	8×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>
Panc-1	T150	DMEM + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
Panc03.27	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1 мМ пірувата натрію + 4,5 г/л глюкози + 0,01мг/мл інсуліну + 15 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
Panc05.04	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1 мМ пірувата натрію + 4,5г/л глюкози + 0,01 мг/мл інсуліну + 15 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
Субклони Panc05.04	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1 мМ пірувата натрію + 4,5 г/л глюкози + 0,01 мг/мл інсуліну + 15 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	7×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>
Patu8902	T150	DMEM+ 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	5×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
Patu8902- LVT	T150	DMEM+ 10 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 9 мкг/мл бластицидину (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	5×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>6</sup>
Patu8988T	T150	DMEM + 5 % кінської сироватки + 5 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	3×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>6</sup>
Patu8988S	T150	DMEM + 5 % кінської сироватки + 5 % FCS	5-7,5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,5×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>
Su86.86	T150	RPMI + 10 мМ HEPES + 1 мМ пірувата натрію + 4,5 г/л глюкози + 10 % FCS	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	5×10 <sup>6</sup>	3×10 <sup>6</sup>
Suit-2	T150	RPMI + 10 % FCS (використовувати нову колбу для кожного відсівання)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,5×10 <sup>7</sup>	1,2×10 <sup>7</sup>
Suit-2-LVT	T150	RPMI + 10 % FCS + 1 % пен./стрепт. + 5 мкг/мл бластицидину (свіжий) (використовувати нову колбу для кожного відсівання)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,5×10 <sup>7</sup>	1,2×10 <sup>7</sup>
SW1990	T150	Leibovitz's L-15 + 10 % FCS	37 °C	4×10 <sup>6</sup>	35×10 <sup>6</sup>
YAPC	T150	RPMI + 10 % FCS Gold	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,5×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>
YAPC-LVT	T150	RPMI + 10 % FCS Gold + 1 % пен./стрепт. + 0,5 мкг/мл бластицидину (свіжий)	5 % CO <sub>2</sub> , 37 °C	1,5×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>7</sup>

<sup>1</sup> LVT - лінії клітин, стабільно трансдуковані лентивірусом для експресії CLDN18.2

<sup>2</sup> щільність посіву в даній колбі або чашці для культивування клітин протягом 2 або 3 днів

<sup>3</sup> adm: клітини рекультивували з підшкірних пухлин.

4. Трансфекція люциферазою клітинних ліній підшлункової залози

Для аналізу ADCC клітини ракових ліній підшлункової залози трансфікували РНК



люциферази. РНК люциферази (вектор Pst1-luc2mut-2hbgutr-a121-Ecii (pst1-109)) одержували з кепом ARCA і розчиняли в H<sub>2</sub>O. Цю РНК зберігали порціями по 22 мкл при -80 °С. Для всіх клітинних ліній підшлункової залози визначали оптимальні умови електропорації, що дають найвищі показники трансфекції й життєздатності клітин. При кожному аналізі клітини відокремлювали за допомогою PBS/5 мМ ЕДТА, розчиняли 2,5×10<sup>6</sup> клітин в 250 мкл X-Vivo і змішували в охолоджуваних льодом кюветах з 10 мкг РНК. Клітини відразу ж піддавали електропорації (Genepulser Xcell, Biorad) і ресуспендували в підігрітому середовищі для аналізу, доводячи їх концентрацію до 5×10<sup>5</sup> клітин/мл. Перевірені умови електропорації для всіх клітинних ліній були такі:

EP1: 250 В, 475 мкФ  
EP2: 200 В, 300 мкФ  
EP3: 150 В, 300 мкФ  
EP4: 200 В, 400 мкФ  
EP5: 250 В, 950 мкФ  
контроль: 0 В, 0 мкФ.

Життєздатність клітин визначали відразу після електропорації за допомогою CASY або фарбуванням клітин трипановим синім і визначенням відсотка мертвих клітин у камері Neubauer. Клітини висівали в чотирьох повторах у білі 96-коміркові планшети (2,5×10<sup>4</sup> клітин на комірку) і інкубували протягом 24 год. Після цього вимірювали люциферазну активність у лімінометрі (Tecan Infinite200) після додавання суміші люциферина протягом 90 хв. Трансфекція була успішною, а ADCC вимірної, якщо значення RLU становили >1000.

5. Кількісна реакція ПЛР у реальному часі (кількісна ПЛР)

Для виділення РНК із клітин ракових ліній підшлункової залози клітини висівали в чашки на 10 див і культивували 2-3 дня, до 80 %-ї конфлюентності. РНК виділяли відповідно до інструкцій, прикладених до набору Rneasy® Mini Kit (Qiagen). Одержання кДНК проводили відповідно до інструкцій виробника, що входять у набір Superscript® III First Strand Kit (Invitrogen). Зразки РНК і кДНК зберігали при -80 °С.

Кількісний аналіз транскриптів CLDN18.2 проводили шляхом ампліфікації оліго(dt)-примірованої кДНК у реакції ПЛР на 40 циклів з використанням ПЛР-праймерів #5054s (5' --AGAGAGCTCTGGCTTCACCGAGTG-3') і #5060as (5' --CCAGAAGTTAGTCACCAGCATGTTGG-3'), що відрізняють ізоформи CLDN18.1 і CLDN18.2. Реакційну суміш готували з барвником SYBR Green (Quantitect SYBR Green PCR Kit, Qiagen), який інтеркалює у дволанцюгову ДНК. Реакції й вимірювання проводили на приладі ABI-PRISM7900 Sequence Detection System з використанням програмного забезпечення (Applied Biosystems).

Відносні рівні експресії транскриптів CLDN18 обчислювали за значеннями ΔΔСТ щодо гена домашнього господарства HPRT.

6. Аналіз методом Вестерн-блот

Для виділення білків із клітин ракових ліній підшлункової залози клітини висівали в чашки на 10 див і культивували 2-3 дня, до 80 %-ї конфлюентності. Клітини лізирували додаванням 800 мкл 4×буфера з SDS для зразків (34 % гліцину, 250 мМ трис рН 6,8, 5 % β-меркаптоетанола, 8,2 % SDS). Для руйнування геномної ДНК зразки білка обробляли ультразвуком при наступних умовах: вихідна потужність: level1, робочий цикл: 70 % протягом 20-25 сек. Концентрацію білка вимірювали на спектрофотометрі (поглинання при 280 нм), а зразки зберігали при -80 °С до використання.

Для виявлення експресії CLDN18.2 на вестерн-блотах готували 12,5 % поліакриламідний гель для поділу (для 2 невеликих гелів: 4,1 мл суміші акриламід/бісакриламід 29:1, 100 мкл 10 % SDS, 2,5 мл трис рН 8,8, 3,2 мл H<sub>2</sub>O, 100 мкл APS, 10 мкл TEMED) між двома фіксованими скляними пластинами. Після полімеризації на цей гель нашаровували концентруючий гель (1,5 мл суміші акриламід/бісакриламід 29:1, 100 мкл 10 % SDS, 2,5 мл трис рН 6,8, 5,8 мл H<sub>2</sub>O, 100 мкл APS, 10 мкл TEMED) і між скляними пластинами вставляли в нього гребінку. Після полімеризації на гель наносили по 75 мкг кожного зразка білка, приготовленого додаванням (1:20) 4×буфера з SDS для зразків (250 мМ трис-HCl, 34 % гліцерину, 8,2 % SDS, рН 6,8) і 7,5 мкл суміші маркерів розміру (1,5 мкл Magic Mark XP Western Standard разом з 6 мкл Seablue Plus2 Prestained Standard). Гелі розганяли в 1× робочому буфері з SDS (25 мМ трис, 0,192 М гліцину, 0,1 % SDS) по 30 хв. при 80 У і 60 хв. при 180 В. Напівсухий блотинг гелю на нітроцелюлозну мембрану проводили протягом 90 хв. при 160 мА в 1× буфері для переносу (25 мМ трис, 0,192 мМ гліцину, 20 % метанолу). Блоти спочатку блокували в 5 % розчині сухого молока в PBS, а потім додавали первинні антитіла (0,25 мкг/мл проти клаудину 18 (С-кінець) або 0,1 мкг/мл проти β-актину) в 1 % розчині сухого молока в PBS. Блоти інкубували протягом ночі при 4 °С, промивали 3 рази по 10 хв. в 1×PBS/0,05 % Tween 20, а потім інкубували 1 годину

з міченими вторинними антитілами за кімнатної температури в 1 % розчині сухого молока в PBS (козячі проти IgG кролика (FC) у розведенні 1:1000). Блоти знову промивали 3 рази по 10 хв. в 1× PBS/0,05 % Tween 20, а потім проводили детектування додаванням 1-3 мл розчину для детектування (Pico and Dura Detection System (Pierce) на 1 хв. і скануванням блотів у детекторній камері LAS-3000 (інкремент: 10 с, інтервальний час: 10 с, чутливість: висока) відповідно до GA\_056\_Chemolumineszenzentwickler LAS3000.

#### 7. Проточна цитометрія (FACS)

Клітини з експоненціально зростаючої культури при конфлюентності 70-85 % збирали за допомогою PBS з 5 мМ ЕДТА або трипсину з ЕДТА. Клітини підраховували, центрифугували 5 хв. (468×g), а осад ресуспендували в буфері FACS (2 % FCS, 0,1 % азиду натрію в PBS), доводячи концентрацію до  $2 \times 10^6$ /мл. По 100 мкл клітин висівали в круглодонні 96-коміркові планшети й знову центрифугували (5 хв., 468×g). Робили серійні розведення IMAV362 (або ізотипового контролю - ритуксимаб) від 0,1 до 200 мкг/мл (11 ступенів розведення + контроль без антитіл) в 50 мкл буфера FACS і додавали до клітин на 30 хв. при 4 °C. Потім у кожну комірку додавали 200 мкл буфера FACS і центрифугували планшети (5 хв., 468×g). Видаляли супернатанти й повторювали промивання. Вторинні козячі антитіла проти людини (Fc-специфічні, F(ab')<sub>2</sub>, кон'юговані з APC (Dianova)) розбавляли 1:100 у буфері FACS і додавали по 30 мкл у кожну комірку. Планшети інкубували 30 хв. при 4 °C. Після інкубації планшети знову двічі промивали по 200 мкл буфера FACS, а осад остаточно ресуспендували в 100 мкл буфера FACS для вимірювання на FACS Array Bioanalyzer (BD) відповідно до GA\_018\_BD FACS Array Bioanalyzer.

#### 8. Лентивірусна трансдукція

Конструювання лентивірусного вектора. Лентивіруси відносяться до РНК-вірусів, які стабільно вбудовуються в геномну ДНК людини, як тих клітин, що діляться, так і тих, які не діляться. За основу був прийнятий вектор plenti6.4 (Invitrogen). Він містить ген бластицидину для відбору позитивно трансдукованих клітин. У рекомбінантну область вектора клонували CLDN18.2, злитий із промотором EF1α, одержуючи pl64B42E (EF1α-hclaudin18.2)-Blasticidin (Fig. 1).

Вибір клітинних ліній. Клітинні лінії вибирали за даними літератури або з тих, що тестувалися раніше *in vivo*. Критерії відбору включали однорідний підшкірний ріст у мишей nude і терапевтичне вікно в 20-100 днів. Були включені три клітинні лінії (DANG, YAPC і BxPC3), які вже показали слабку експресію мРНК CLDN18.2, і ще три (MiaPaCa-2, Patu8902 і Suit-2), здатні до утворення метастаз за даними літератури. Дві інші клітинні лінії (які ростуть у вигляді однорідних підшкірних пухлин *in vivo*) були обрані випадковим чином (HPAC, CAPAN1).

Визначення умов відбору за бластицидином. Для всіх клітинних ліній перед трансдукцією визначали, яка концентрація бластицидину необхідна для відбору клітин після лентивірусної трансдукції. Ракові клітини підшлункової залози висівали в 6-коміркові планшети при високій щільності, що дає конфлюентність в 80-90 % через 24 години. У комірки додавали бластицидин (початково: 10 мкг/мл, Invitrogen) у зростаючих концентраціях від 0,5 до 12 мкг/мл (5 ступенів розведення + контроль без бластицидину). Середовище міняли кожні 3-4 дні, а клітини аналізували під мікроскопом перед видаленням середовища. Відзначали кількість мертвих клітин і стан живих клітин. Клітини культивували протягом 14 днів. Для відбору трансдукованих лентивірусом клітин використовували найменшу концентрацію бластицидину, яка викликає 100 %-й апоптоз клітин через 14 днів. Необхідні концентрації бластицидину для кожної з отриманих LVT-ліній клітин наведено в таблиці 4.

Вибір оболонки. Для лентивірусної трансдукції контрольний GFP-лентивірусний вектор pL64B42E-(EF1α-GFP)-blast упаковували в частки з різними оболонками (VSV-G, GALV, RD114, Mokola-G і Rabies-G). Залежно від білків, які присутні в оболонці, і складу клітинної мембрани, прикріплення до ракових клітин мішені було більш-менше ефективним. Для всіх ракових ліній клітин підшлункової залози оболонка VSV-G давала найвищу ефективність трансдукції (68,5-91,2 %) (таблиця 5). Тому вектор, який експресує CLDN18.2 pl64B42E (EF1α-hclaudin18.2)-Blasticidin упаковували в оболонки VSV-G. Інфікували клітини-продуценти й виділяли вірус із середовища при високому титрі ( $3,86 \times 10^7$  часток/мл). Вірусні супернатанти зберігали при -80 °C.

Таблиця 5

Одержання гіперекспресуючих CLDN18.2 ліній ракових клітин підшлункової залози за допомогою лентивірусної трансдукції

Клітинна лінія	Оболонка (контрольний GFP-вірусний вектор)					Ефективність трансдукції pL64B42E (EF1 $\alpha$ -hCLAudin18.2) <sup>1</sup>
	VSV-G	GALV	RD114a	Mokola-G	Rabies-G	
BxPC3-LVT	91,1	29,5	21,4	61,4	57,1	92,8 %
CAPAN1-LVT	83,7	12,3	31,7	24,3	23,1	89,6 %
DANG-LVT	91,2	41,3	13,8	33,7	41,4	87,5 %
HPAC-LVT	77,7	38,4	49,6	72,8	61,5	97,3 %
MiaPaCa-2-LVT	н/з	н/з	н/з	н/з	н/з	96,3 %
Patu8902-LVT	н/з	н/з	н/з	н/з	н/з	93,0 %
Suit2-LVT	н/з	н/з	н/з	н/з	н/з	92,2 %
YAPC-LVT	68,5	41,3	13,8	33,7	41,4	82,2 %

<sup>1</sup> Ефективність при упакуванні вектора в частки з оболонкою VSV-G при вимірі через 2 дні після трансдукції.

Лентивірусна трансдукція клітин ракових ліній підшлункової залози. Для інфікування клітин намічених ракових ліній підшлункової залози 24-комірковий планшет покривали 200 мкл 1×retronectin® (20 мкг/мл, Takara Inc.), щільно закривали його парафільмом і інкубували 3-16 год. при 4 °C. Планшети промивали 200 мл PBS і блокували PBS/2 % BSA протягом 30 хв. за кімнатної температури. Планшети знову промивали й наносили по 300 мкл вірусного супернатанта із центрифугуванням 25 хв. при 2500 об./хв. при 15 °C. Супернатант видаляли й повторювали нанесення 3 рази. Нарешті планшети промивали один раз PBS і в кожен комірку висівали намічені клітини з низькою кількістю пересівань. Для всіх ліній ракових клітин підшлункової залози висівали по  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^7$  клітин у кожен з 24 комірок. Планшети інкубували 2 дні при 37 °C. Після цього клітини відокремлювали й визначали ефективність трансдукції методом FACS з використанням міченого FITC антитіла IMAB362. Клітини піддавали експансії й для кожної клітинної лінії готували майстер-банк клітин.

#### 9. Аналіз ADCC

Намічені ракові клітини підшлункової залози висівали в колби заздалегідь за два дні, щоб одержати конфлюентні на 80-90 % культури в день початку ADCC. Ракові клітини підшлункової залози трансфікували РНК люциферази й висівали в білі 96-коміркові планшети при щільності  $1 \times 10^4$  клітин на комірку в 50 мкл середовища визначення (культуральне середовище, наведено в таблиці 4, з 20 мМ HEPES). Крім того, висівали клітини NUGC-4 sub10ch11 sube10 Luci#2 (8000 клітин на комірку) як позитивного контролю при всіх аналізах. Клітини культивували 4-6 год. перед додаванням антитіл і очищених PBMCs.

PBMCs одержували зі свіжої лейкоцитної плівки людини, отриманої від здорових донорів. Три порції крові по 20-25 мл розбавляли PBS (1:2) і обережно нашаровували на 4 порції по 15 мл Ficol-Paque Plus (GE Healthcare) у пробірках Falcon на 50 мл. Градієнти центрифугували (25 хв., 700×g). Після центрифугування з інтерфазу збирали мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC), промивали в PBS з 2 мМ EDTA, центрифугували (5 хв., 468×g), знову суспендували в PBS з 2 мМ EDTA й центрифугували (10 хв., 208×g), щоб вилучити тромбоцити. Опади ресуспендували в 50 мл PBS з 2 мМ EDTA й проводили підрахунок клітин. PBMC центрифугували (5 хв., 468×g) і ресуспендували в культуральному середовищі X-Vivo-15 при концентрації  $1,6 \times 10^7$  клітин/мл для додавання до клітин підшлункової залози або  $1,28 \times 10^7$  клітин/мл для додавання до клітин NUGC-4 sub 10ch11 sub E10 Luci#2.

Антитіла (IMAB362 і антитіло ch78H11-1H6 з ізотипового контролю) піддавали серійному (4,5-разовому) розведенню по 10 разів, одержуючи концентрації від 200 мкг/мл до 0,26 нг/мл. З кожного розведення по 25 мкл додавали в чотирьох повторях до намічених клітин. У комірки з контролем на середовище й на лізис додавали PBS без антитіл. Після цього в кожен комірку додавали 25 мкл PBMC (співвідношення E:T = 40:1) і інкубували планшети протягом 24 год.  $\pm 1$  год. при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

Наступного дня в комірки з контролем на лізис додавали по 10 мкл 8 % розчину Triton

X100/PBS, а в усі інші комірки - по 10 мкл PBS. Нарешті, у кожную комірку додавали 50 мкл свіжоприготовленого розчину люциферина (160 мм HEPES, 1×PBS, 3,84 мг/мл D-Люциферина (BD Biosciences)) і інкубували планшети 80 хв. за кімнатної температури в темряві. Вимірювали люмінесценцію в результаті окиснення Lucifer Yellow люциферазою життєздатних клітин на зчитувальному обладнанні для мікропланшетів (Infinite200, Tecan, Швейцарія). Ступінь клітинному цитотоксичності розраховували по наступній формулі:

специфічне знищення

$$(\%) = 100 - [(RLU_{\text{проба}} - RLU_{\text{Triton}}) / (RLU_{\text{контр. на серед}} - RLU_{\text{Triton}})] \times 100].$$

10. CDC

Аналіз CDC проводили в такий спосіб.

Намічені клітини (CHO-K1 p740 MACS/FACS (24H5) p3151 Luci#2A5) висівали в 50 мкл середовища визначення в білі 96-коміркові планшети для аналізу (10 000 клітин на комірку) і культивували протягом 24 год. + 20 хв. при 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> за відносної вологості 95 % перед додаванням зразків. Кожний 96-комірковий планшет містив у цілому 3 різних негативних контролю (інактивована нагріванням сироватка, сироватка з IMAB362 і без нього й сироватка з антитілом з ізотипового контролю (Rituximab)) і позитивний контроль зі збірної сироватки здорової людини (lot #31032011) з 500 нг/мл IMAB362. Додатковий позитивний контроль одержували по закінченню реакції додаванням 0,8 % Triton X100 у другу комірку контролю на середовище, що викликає повний лізис. Один з 96-коміркових планшетів містив функціональний позитивний контроль, отриманий шляхом 7 серійних 3, 16-разових розведеннях IMAB362 (від 10 000 до 31,8 нг/мл). Цей контроль давав сигмовидну залежність лізису клітин від дози. Усі зразки готували (по 200 мкл) у той саме час в 96-комірковому планшеті з поглибленими комірками для розведення. З кожної комірки брали проби по 3 рази піпеткою, щоб одержати по три повтори в планшетах для аналізу. Після внесення по 50 мкл досліджуваних і контрольних проб у планшети для аналізу їх інкубували протягом 80+5 хв. при 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> за відносної вологості 95 %.

У кожную комірку додавали по 10 мкл PBS, за винятком комірок контролю на лізис із тритоном. У кожную комірку контролю на лізис із тритоном додавали по 10 мкл 0,8 % розчину Triton/PBS. Готували розчин субстрату - люциферина (6114 мкл бідист. води, 2496 мкл HEPES (1M), 1998 мкл 1×DPBS, 4992 мкл вихідного розчину D-люциферину (12 мг/мл)). У кожную комірку додавали 50 мкл розчину субстрату - люциферину. Планшети інкубували при 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> за відносної вологості 95 % протягом 45 хв. Планшети вимірювали на зчитувальному обладнанні для мікропланшетів.

Комплемент-залежний лізис розраховували за наступною формулою:

$$\text{специфічний лізис } (\%) = 100 - [(RLU_{\text{проба}} - RLU_{\text{triton}}) / (RLU_{\text{HSCM}} - RLU_{\text{triton}})] \times 100]$$

Модифікації для тестування ракових ліній клітин підшлункової залози:

- ракові клітини підшлункової залози трансфікували РНК люциферази за оптимізованих умов; для кожної тестованої клітинної лінії висівали по 1,5×10<sup>4</sup> клітин на комірку;

- оскільки більшість ракових ліній клітин підшлункової залози із труднощами відділяються й утворюють одиночні клітини, то в 1-й день використовували трипсин;

- ракові клітини підшлункової залози культивували в планшетах для аналізу при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>;

- аналіз CDC із передобробкою клітин хіміотерапевтичними засобами проводили при наступних концентраціях IMAB362 або як ізотиповий контроль - антитіла ch78H11 1H6: 640 000, 160 000, 40 000, 10 000, 2 500, 625, 156 і 39 нг/мл.

11. Інгібування проліферації

Для аналізу кривих доза-відповідь для кожного хіміотерапевтичного засобу проводили аналіз проліферації. Аналізували інгібування проліферації після застосування гемцитабіну або оксаліплатину в різних концентраціях для кожної лінії ракових клітин підшлункової залози.

Таблиця 6

Ракові лінії клітин підшлункової залози при аналізі ефективності гемцитабіну або оксаліплатину

Клітинна лінія	Число клітин на комірку при посіві
BxPC3-LVT	5000
BxPC3	5000
Panc05.04	5000
BxPC3-LVT	5000
CAPAN1-LVT	5000
DANG	2000
MiaPaCa-2-LVT	7000
Patu8988S	10000
Patu8988Sp3151#6	15000

Клітини висівали в 96-коміркові планшети й через 4-6 годин додавали гемцитабін або оксаліплатин у наступних концентраціях: 1000, 500, 250, 100 і 20 нг/мл. Для аналізу проліферації клітини інкубували 4 дні при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Додавали 50 мкл повного реагенту ХТТ (50 частин ХТТ + 1 частина реагенту, що зшиває) і інкубували при 37 °C. Через 3 год. і 4 год. проводили вимір поглинання (клітини плюс супернатант) на Тесла Safire. Розраховували інгібування проліферації в порівнянні з контролем на середовищі, прийнятим за 100 %. Значення EC<sub>50</sub> для гемцитабіну й оксаліплатину розраховували в програмі Graphpad Prism.

12. Культивування клітин ракових ліній підшлункової залози з хіміотерапевтичними препаратами для ADCC або CDC

Лінія DANG: висівали 4-6×10<sup>6</sup> клітин і культивували 2 дні в середовищі або в середовищі + 1 нг/мл гемцитабіну або 1 нг/мл гемцитабіну + 10 нг/мл оксаліплатину. Лінія Patu8988S: висівали 1-1,4×10<sup>7</sup> клітин і культивували під час відсутності або в присутності 10 нг/мл гемцитабіну або 10 нг/мл гемцитабіну в комбінації з 100 нг/мл оксаліплатину.

У день початку ADCC додержувалися вищеписаної методики й визначали експресію CLDN18 на клітинній поверхні методом FACS, як описано вище.

13. Аналіз клітинного циклу

Клітини засівали в 6-коміркові планшети й через 5-6 годин додавали хіміотерапевтичні засоби на 24 год, 48 год. або 3 дні. Вільноплаваючі в середовищі клітини поєднували із клітинами адгезійного шару, який піддавали трипсинизації. Клітини промивали. Аналіз клітинного циклу або починали відразу ж, або спочатку проводили фарбування клітинної поверхні, як описано вище. Клітини ресуспендували в 1 мл PBS і вносили в 3 мл 4 % PFA. Після фіксації клітин 15 хв. за кімнатної температури клітини осаджували й промивали. Для обробки РНКазою клітини ресуспендували в 200 мкл РНКази (10000 Од./мл) плюс 0,05 % Triton X-100 і інкубували 30 хв. при 37 °C. Додавали 1 мл PBS, зразки центрифугували й ресуспендували в 200 мкл PBS з 50 мкг/мл РІ. Уже через 30 хвилин зразки були готові для аналізу методом проточної цитометрії. Розподіл фаз клітинного циклу визначали за допомогою програмного забезпечення Flowjo у вигляді гістограм вмісту ДНК.

14. Аналіз апоптозу

Після зазначених процедур вимірювали апоптоз за зв'язуванням анексину V (набір для виявлення I) або по фрагментації ДНК (Apo-Direct) згідно з рекомендаціями виготовлювача (Pharmingen, San Diego, CA). Коротко, вільноплаваючі в супернатанті клітини поєднували із клітинами адгезійного шару, який піддавали трипсинизації, а потім промивали. Порції по 5×10<sup>5</sup> клітин інкубували з анексином V-APC і PI протягом 15 хв. за кімнатної температури в темряві. Клітини відразу ж аналізували методом проточної цитометрії. Життєздатні клітини не містять ні анексину V-APC, ні PI. У ранній стадії апоптозу клітини позитивні на анексин V-APC і негативні на PI, тоді як клітини, що втратили життєздатність внаслідок апоптотичної або некротичної смерті клітин, дають позитивне фарбування й на анексин V, і на PI. Відсоток пофарбованих клітин у кожному квадранті кількісно визначали за допомогою програмного забезпечення Flowjo (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Аналіз апоптозу за фрагментацією ДНК проводили в такий спосіб. Оброблені клітини (прикріплені й плаваючі) фіксували в 70 % крижаному етанолі протягом ночі. Після промивання інкубували 10<sup>6</sup> фіксованих клітин з ферментом термінальна дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) і FITC-dUTP протягом 90 хв. при 37 °C, щоб позначити розриви ДНК. Клітини промивали,

інкубували із РНКазою А і йодидом пропідію в темряві 30 хв. за кімнатної температури для фарбування тотальної ДНК, а потім аналізували методом проточної цитометрії. Подвійні й злиплі клітини виключалися з аналізу при налаштуванні каналів.

#### 15. Дослідження in vivo

Усі експерименти in vivo проводилися відповідно до національних правил і етичних принципів для експериментальних досліджень на тваринах.

##### 15.1. Обробка ксенотрансплантатів

Ксенотрансплантати пухлин прищеплювали шляхом підшкірної ін'єкції ракових клітин в 200 мкл PBS у бік самкам безтімусних мишей nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup>. Несучі пухлини миші одержували 0 мкг, 200 мкг, 400 мкг або 800 мкг антитіл шляхом в/в ін'єкції раз на тиждень або ж чергуючи в/в і в/о введення 2 рази на тиждень. Хіміотерапевтичні засоби вводили в/о раз на тиждень або 2 рази на тиждень. Розмір пухлин і стан тварин відслідковували по 2 рази на тиждень. По закінченню хіміотерапії введення антитіл тривало доти, поки розмір пухлин не досягав >1400 мм<sup>3</sup> або ж на пухлинах утворювались виразки. Зразки пухлин зберігали замороженими або фіксованими в 4 % формаліні для наступного аналізу.

##### 15.2. Аналіз утворення метастаз

Різні лінії ракових клітин підшлункової залози спочатку піддавали аналізу на їхню здатність до утворення метастазів після внутрішньовенного введення цих клітин мишам nude. Для аналізу їх приживання групам з 5-10 мишей вводили  $1 \times 10^6$  і/або  $2 \times 10^6$  клітин і в різні моменти часу забивали по одній миші, щоб знайти моменти часу приживання й росту метастазів.

Обробку метастазів проводили на 10-12 безтімусних мишах nude Hsd:Foxn1<sup>nu</sup> в 1 групі обробки. Їм вводили по  $2 \times 10^6$  клітин (Patu8988S або Suit2-LVT) внутрішньовенно. Усіх мишей забивали в той самий час, як тільки з'являлися перші симптоми утворення метастаз (втрата ваги, слабкість, задишка) або ж гинула перша миша.

Препарування тканин. При дослідженні приживання мишей забивали в різні моменти часу або як тільки в них з'являлися чіткі фізіологічні ознаки утворення метастаз (втрата ваги, слабкість, задишка). Усі органи в них піддавали макроскопічному аналізу на метастази. Тільки при клітинах Patu8988S і Suit-2 у легенів і легенів/печінки проявлялися макроскопічно помітні метастази, відповідно. Ці органи висікали на 4 рівних шматочка, з яких два (легені: верхня права й нижня ліва частки) зберігали для виділення геномної ДНК. Два інших шматочка фіксували у формаліні й зберігали для ІНС-аналізу (Фіг. 2).

Одержання геномної ДНК і стратегія кількісної ПЛР. Геномну ДНК екстрагували із тканини легенів або печінки. Як контроль геномну ДНК також виділяли з ракових клітин підшлункової залози Patu8988S людини, а також із мишей негативного контролю, які не одержували ін'єкцій.

Стратегія кількісної ПЛР ґрунтується на ампліфікації ДНК людини, яка присутня у метастазах. Відносний рівень ДНК людини, виявленої в зразках легенів миші, прямо корелює з кількістю й/або розміром метастазів. Оскільки цей метод може мати зсув тому, що метастази в легенях розподіляються нерівномірно й іноді одна частина уражена більше, ніж інша, то для одного препарату ДНК змішували дві різні ділянки легенів (Фіг. 2).

Реакції кількісної ПЛР проводили з парою праймерів #5861: 5'-GGGATAATTTTCAGCTGACATAACAG-3' і #5862: 5'-TTCCGTTTAGTTAGGTGCAGTTATC-3', які специфічно ампліфікують альфа-сателітну ДНК, яка присутня в 17-й хромосомі людини, але не в ДНК миші. Для складання стандартної кривої й як позитивного контролю ДНК Patu8988S змішували із ДНК миші й готували 5-разові розведення, одержуючи 100 %, 20 %, 4 %, 0,8 %, 0,16 %, 0,032 % і 0,0064 % ДНК людини в ДНК миші. Цю криву використовували для обчислення (лінійна регресія) кількості ДНК метастазів людини в тканині легенів миші. Реакції кількісної ПЛР проводили в кінцевому обсязі 50 мкл, що містить 20 мкл (200 нг) ДНК легенів миші, 25 мкл SYBR Green (Qiagen), 1,6 мкл значеннєвого праймера (10 мкМ) і 1,6 мкл антизначеннєвого праймера й 1,8 мкл H<sub>2</sub>O.

Приклад 2. Експресія CLDN18.2 у нормальних і пухлинних тканинах підшлункової залози людини

Для аналізу рівня й профілю експресії CLDN18.2 у нормальних і пухлинних тканинах підшлункової залози проводили гістологічне фарбування FFPE-зрізів за допомогою двох мишачих моноклональних антитіл (Фіг. 3).

Пошукові пілотні експерименти проводили з використанням первісного антитіла 35-22A на мікроматрицях тканин (Tmas). Головним недоліком Tmas є варіабельна якість нанесених тканин і малий розмір плям, тобто нерепрезентативність проб. Поряд з не повністю оптимізованою методикою фарбування, це могло приводити до недооцінки позитивних випадків.

Основні експерименти проводили з антитілом 43-14A. При цьому фарбування проводили на зрізах тканин, які (у порівнянні з Tmas) були крупнішими й зазнавали попередньої оцінки на

наявність пухлинних клітин.

Передракові вогнища ураження, які походять із протоків підшлункової залози, можна ранжувати відповідно до міжнародної системи інтраепітеліальної неоплазії підшлункової залози (pancreas intraepithelial neoplasia, PanIN) (підтипи PanIN-1A, -1B, -2, -3).

Вогнища типу PanIN-1 (Фіг. 4A) плоскі, складаються з високих стовпчастих клітин з базально розташованими ядрами й рясним супрануклеарним муцином. Ядра маленькі й круглої або овальної форми, орієнтовані перпендикулярно до базальної мембрани. Існує гістологічне перекривання між плоскими непухлинними гіперпластичними вогнищами й плоскими пухлинними вогнищами без атипії.

Вогнища підтипу PanIN-1B мають папілярну, мікропапілярну або базальну псевдобагатошарову архітектуру й в іншому ідентичні до PanIN-1A (Hruban et al., Am J Surg Pathol. 2001, 25(5):579-86).

Вогнища типу PanIN-2 (Фіг. 4B) плоскі або папілярні, мають характерні ядерні аномалії, включаючи деяку втрату полярності, ущільнення, збільшення розмірів, псевдостратифікацію й гіперхроматизм ядер. Мітози зустрічаються рідко, але якщо вони є, то не люмінальні (не апікальні) і не атипові (Hruban et al., Am J Surg Pathol. 2001, 25(5):579-86).

Вогнища типу PanIN-3 (Фіг. 4C) звичайно папілярні або мікропапілярні, однак зрідка вони можуть бути плоскими. Дійсна решітчатість, відбрунькування невеликих кластерів епітеліальних клітин у просвіт і люмінальний некроз свідчать про діагноз PanIN-3. Вогнища характеризуються втратою полярності ядер, дистрофічними бокаловидними клітинами (бокаловидні клітини з ядрами, орієнтованими в просвіт, і мукоїдною цитоплазмою, орієнтованою до базальної мембрани), мітозами, які іноді можуть бути аномальними, неоднорідністю ядер, що й виділяються (макро)-ядерцями (Hruban et al., Am J Surg Pathol. 2001, 25(5):579-86).

Експресію CLDN18.2 у передракових тканинах аналізували за допомогою антитіла 43-14A на зразках тканин з різних джерел. CLDN18.2 часто виявлявся в структурах PanIN підтипів PanIN-1, -2 і -3, що свідчить про ранню експресію CLDN18.2 у передракових вогнищах (Фіг. 4), яка зберігається й на більш пізніх стадіях. Напроти, експресія не спостерігалася в зразках нормальних тканин підшлункової залози, включаючи протоки підшлункової залози. Таким чином, CLDN18.2 є раннім маркером початку злоякісних гістологічних змін у протоках підшлункової залози.

Для оцінки експресії CLDN18.2 при первинному раку підшлункової залози проводилися два дослідження. У пілотному дослідженні кілька тканинних мікроматриць (Tmas), що включають у цілому 141 випадок первинного раку підшлункової залози, піддавали фарбуванню специфічним до CLDN18.2 моноклональним антитілом 35-22A. У цілому якість аналізованих Tmas була незадовільною. Багато плям були частково загублені під час відтворення епітопів, а неоднорідне контрастне фарбування гематоксиліном свідчить про субоптимальну FFPE-обробку тканин.

У цілому >48,9 % випадків фарбування були позитивними на CLDN18.2, у тому числі 49,2 % (65/132) аденокарцином проток, 50 % (1/2) ацинозно-клітинних карцином і 3 з 7 нейроендокринних карцином (таблиця 7). Мембрани пухлинних клітин фарбувалися без якого-небудь тла на інших типах клітин (Фіг. 6). Більше того, спостерігалася кореляція між інтенсивністю експресії CLDN18.2 і вмістом пофарбованих пухлинних клітин у пухлині (таблиця 8, фіг. 5).

Таблиця 7

Пілотне дослідження: розбивка CLDN18.2-позитивних випадків за підтипами раку підшлункової залози. Проводили фарбування тканин за допомогою моноклонального мишачого антитіла 35-22A (0,2 мкг/мл) і оглядали їх на наявність CLDN18.2-позитивних пухлинних клітин

Первинний рак підшлункової залози	Усього	Частка позитивних становить $\geq 1$ % [%]	Інтенсивність фарбування становить $\geq 2+$ [%]
Усього	141	69 [48,9]	62 [43,9]
Аденокарцинома проток	132	65 [49,2]	58 [44,3]
Ацинозно-клітинна карцинома	2	1 [50,0]	1 [50,0]
Нейроендокринна карцинома	7	3 [42,8]	3 [42,8]

Таблиця 8

Пілотне дослідження: кореляція між інтенсивністю сигналу CLDN18.2 і кількістю позитивних пухлинних клітин при аналізі первинних пухлин підшлункової залози. Відсоток позитивних серед первинних пухлин корелює з інтенсивністю фарбування. Випадки згруповані на шість фракцій залежно від кількості позитивних пухлинних клітин для наочності

% позит. клітин	Інтенсивність сигналу			
	+	++	+++	Разом
усього	7	24	38	69
1-9 %	3 [42,8]	6 [25,0]	1 [2,6]	10 [14,5]
10-39 %	2 [28,6]	6 [25,0]	5 [13,2]	13 [18,8]
40-49 %	0	0	1 [2,6]	1 [1,4]
50-59 %	0	3 [12,5]	2 [5,3]	5 [7,3]
60-69 %	0	2 [8,3]	5 [13,2]	7 [10,2]
70-100 %	2 [28,6]	7 [29,2]	24 [63,1]	33 [47,8]

Таблиця 9

Пілотне дослідження: градація CLDN18.2-позитивних випадків пухлин. Градація пухлинних клітин проводиться за зовнішнім виглядом й ступенем диференціювання клітин. При цьому 1-й ступінь означає добре диференційовані клітини, 2-й ступінь - помірно диференційовані й 3-й ступінь - погано диференційовані клітини

Ступінь	Усього	Частка позитивних становить $\geq 1$ % [%]	Інтенсивність фарбування становить $\geq 2+$ [%]
1	15	13 [86,7]	12 [80,0]
2	71	39 [54,9]	36 [50,7]
3	35	9 [25,7]	7 [20,0]

Друге дослідження проводили за оптимізованою методикою фарбування з високочутливим антитілом 43-14A, використовуючи перевірені на якість зрізи тканин.

5

Таблиця 10

Основне дослідження: розбивка CLDN18.2-позитивних випадків за підтипами раку підшлункової залози. Проводили фарбування тканин за допомогою моноклонального мишачого антитіла 43-14A (0,2 мкг/мл) і оглядали їх на наявність CLDN18.2-позитивних пухлинних клітин

Первинний рак підшлункової залози	Усього	Частка позитивних становить $\geq 1$ % [%]	Інтенсивність фарбування становить $\geq 2+$ [%]
Усього	61	40 [65,6]	39 [63,9]
Аденокарцинома протоків (PDAC)	42	38 [90,5]	37 [88,1]
Ацинозно-клітинна карцинома	1	0	0
Нейроендокринна карцинома	18	2 [11,1]	2 [11,1]

Таблиця А

первинна холангіокарцинома	усього	позитивні	% позитивних
холангіокарцинома	15	9	60

10

Таблиця В

У цілому проаналізували 42 зразка первинного раку протоків підшлункової залози. Близько 90 % (38 з 42 випадків) з них були позитивними на CLDN18.2 (таблиця 10), причому більшість



(>60 %) проявляло більшу інтенсивність сигналу +++ (Фіг. 7, таблиця 11). При цьому також спостерігалася кореляція між рівнем експресії CLDN18.2 і вмістом позитивних пухлинних клітин. Більшість аналізованих випадків (62 %) становили пухлини 3-й ступені (таблиця 12).

Таблиця 11

Основне дослідження: кореляція між інтенсивністю сигналу CLDN18.2 і кількістю позитивних пухлинних клітин при аналізі первинних пухлин підшлункової залози. Відсоток позитивних серед первинних пухлин корелює з інтенсивністю фарбування. Випадки згруповані на шість фракцій залежно від кількості позитивних пухлинних клітин для наочності

% позитивних клітин	Інтенсивність сигналу			
	+	++	+++	Разом
усього	1	13	26	40
1-9 %	1	2 [15,4]	3 [11,5]	6 [15,0]
10-39 %	0	3 [23,0]	4 [15,4]	7 [17,5]
40-49 %	0	2 [15,4]	2 [7,7]	4 [10,0]
50-59 %	0	2 [15,4]	4 [15,4]	6 [15,0]
60-69 %	0	2 [15,4]	1 [3,8]	3 [7,5]
70-100 %	0	2 [15,4]	12 [46,2]	14 [35,0]

5

Таблиця 12

Основне дослідження: градація CLDN18.2-позитивних випадків пухлин. Для більшої частини проаналізованих пухлин була доступна градація, проведена відповідним патоморфологом. Градація пухлинних клітин проводиться за зовнішнім виглядом й ступенем диференціювання клітин. При цьому 1-й ступінь означає добре диференційовані клітини, 2-й ступінь - помірно диференційовані й 3-й ступінь - погано диференційовані клітини

Ступінь	Усього	Частка позитивних становить ≥1 % [%]	Інтенсивність фарбування становить ≥2+ [%]
1	7	1 [14,3]	1 [14,3]
2	25	15 [60,0]	15 [60,0]
3	28	24 [85,7]	23 [82,1]

У більшості пацієнтів рак підшлункової залози діагностується на пізній стадії. Пухлини в пацієнтів уже дали метастази в лімфатичні вузли й інші органи, зокрема, у печінку. В основному дослідженні піддавали аналізу 79 FFPE-зразків тканин лімфатичних вузлів і печінки з метастазами раку підшлункової залози методом імуногістохімії, використовуючи специфічне до CLDN18.2 антитіло 43-14A.

10

В 70,5 % метастазів у лімфатичних вузлах (31/44 випадків) і 68,6 % віддалених метастазів у печінці (24/35 випадків) проявлялося чітке фарбування пухлинних клітин на CLDN18.2 (таблиця 13). Профіль фарбування в позитивних пухлинних клітин був мембранним, у деяких випадках з додатковими слабкими цитоплазматичними сигналами (Фіг. 9). Відповідно до результатів аналізу первинних пухлин була виявлена кореляція між рівнем експресії CLDN18.2 і вмістом CLDN18.2-позитивних пухлинних клітин у зразках метастазів (Фіг. 8).

15

Не було виявлено ніякої кореляції між градацією аналізованих пухлин і рівнем експресії CLDN18.2 або вмістом позитивних пухлинних клітин.

20

Таблиця 13

Кількість CLDN18.2-позитивних випадків метастазів з розбивкою по уражених органах. Проводили фарбування тканин за допомогою моноклонального мишачого антитіла 43-14A (0,2 мкг/мл) і оглядали їх на наявність CLDN18.2-позитивних пухлинних клітин

Метастази	Усього	Частка позитивних становить $\geq 1$ % [%]	Інтенсивність фарбування становить $\geq 2+$ [%]
Усього	79	55 [69,6]	52 [65,8]
З підшлункової в лімфатичні вузли	44	31 [70,5]	28 [63,6]
З підшлункової в печінку	35	24 [68,6]	24 [68,6]

Щоб перевірити, чи зберігається експресія CLDN18.2 у метастазах з позитивних первинних пухлин у того ж пацієнта, проводили скринінг парних зразків первинного раку й метастазів у лімфатичних вузлах за допомогою антитіла 43-14A.

Таблиця 14

Експресія CLDN18.2 у парних зразках первинних пухлин підшлункової залози і їх метастазів у лімфатичних вузлах. Парні зразки первинної аденокарциноми й метастазів у лімфатичних вузлах піддавали аналізу на експресію CLDN18.2 у пухлинних клітинах

Пацієнт	Первинна пухлина	Метастази в лімфоузлах
H/2011/775 3S & 8D	+++ (15 %)	+++ (25 %)
H/2011/2247 7C & 7G	+++ (10 %)	++ (25 %)
H/2011/12675 4B & 4L	+++ (10 %)	++ (5 %)
H/2010/15941 6SS & 8H	+++ (90 %)	+++ (90 %)
H/2010/2986 2E & 2G	+++ (5 %)	+++ (40 %)
H/2010/6709 9B & 9F	+++ (70 %)	+++ (10 %)
H/2010/11569 5A & 5G	+++ (80 %)	++ (5 %)
H/2008/380 4A & 4G	+++ (60 %)	+++ (90 %)
H/2009/13538 5B & 5E	+ (20 %)	+ (10 %)
H/2009/11847 7C & 7F	+++ (15 %)	++ (15 %)
H/2009/23108 4A & 4J	+++ (5 %)	+++ (70 %)
H/2009/4917 8E & 8S	+++ (70 %)	+++ (25 %)
H/2009/214183C & 3L	+++ (55 %)	++ (70 %)
H/2009/20336 2D & 2F	+++ (80 %)	+++ (90 %)
H/2009/17768 2C & 2E	++ (35 %)	++ (20 %)
H/2008/13194 3A & 3J	+++ (35 %)	+++ (10 %)
H/2008/13074 3B & 3C	+++ (50 %)	+++ (50 %)
H/2008/12082 6D & 6G	+++ (1 %)	-
H/2008/11178 5B & 1SS	+++ (80 %)	+++ (90 %)
H/2008/28150 4B & 4C	++ (15 %)	++ (30 %)
H/2007/5478 4A & 4J	+++ (90 %)	+++ (90 %)
H/2007/6216 3B & 3C	+++ (50 %)	+++ (60 %)
H/2007/9047 1B & 1J	+++ (70 %)	+++ (35 %)
H/2007/13983 6C & 6J	++ (15 %)	++ (1 %)
H/2007/14400 6C & 6J	-	-
H/2006/5616 3J & 3D	+++ (35 %)	+++ (5 %)
H/2006/9779 3D & 3K	+ (5 %)	+ (15 %)

В 25 (92,5 %) з 27 проаналізованих випадків і первинна пухлина, і парні до неї лімфатичні вузли були позитивними за CLDN18.2. В одному випадку обидві тканини були негативними, а в одному іншому випадку первинна пухлина була позитивною на CLDN18.2, тоді як метастази були негативними.

В 21 (80,7 %) з 26 позитивних парних зразків інтенсивність сигналу в первинній пухлині й метастатичних пухлинних клітин була однаковою. В 5 випадках інтенсивність сигналу

знижувалася з +++ до ++. В 11 (44 %) з 25 парних зразків тканин число позитивних пухлинних клітин у метастазах було менше, чим у первинної пухлини (таблиця 14).

Таким чином, експресія CLDN18.2 зберігається при переході клітин первинної пухлини в метастазуючу стадію. Загальна інтенсивність і частка позитивних пухлинних клітин у метастазів у лімфатичних вузлах була лише небагато менше, чим у первинної пухлини (Фіг. 10).

У невеликої кількості пацієнтів були доступні зразки тканин, отримані з первинної пухлини, метастазів у лімфатичних вузлах і метастазів у печінці. Ці потрібні пари піддавали фарбуванню для перевірки схоронності експресії CLDN18.2 у віддалених метастазах. Шість таких потрібних пар піддавали аналізу за допомогою антитіла 43-14A.

Таблиця 15

Експресія CLDN18.2 у парних зразках первинних пухлин підшлункової залози і їх метастазів. Парні зразки первинної аденокарциноми, метастазів у печінці й метастазів у лімфатичних вузлах піддавали аналізу на експресію CLDN18.2 у пухлинних клітинах

Пацієнт	Первинна пухлина	Метастази в лімф. вузлах	Метастази в печінці
H/2011/17191 -VA -VI -ISS	+++ (60 %)	+++ (70 %)	+++ (1 %)
H/2010/14296 XA	+++ (5-10 %)	-	-
H/2010/4157 VIIA	++ (60 %)	++ (30 %)	+++ (90 %)
H/2009/23598 VIIB	+++ (40 %)	-	-
H/2011/3590 -IIISS -VIIC -ISS	++ (20 %)	-	-
H/2008/10701	+++ (90 %)	+++ (100 %)	+++ (90 %)

В 3 з 6 потрібних пар усі три зразки тканини були співрозмірними щодо їх позитивності за CLDN18.2 (Фіг. 11). У трьох випадках частина пухлинних клітин у первинній пухлині була позитивною на CLDN18.2, тоді як метастатичні вогнища не проявляли фарбування на CLDN18.2 (таблиця 15).

Приклад 3. Експресія мішені в клітинах ракових ліній підшлункової залози людини, що використовувалися для моделей *in vitro* і *in vivo* і моделей раку підшлункової залози

Джерела клітинних ліній

Головною метою даного доклінічного дослідження був аналіз інгібуючих ефектів застосування IMAB362 на придатних модельних системах. Для ідентифікації CLDN18.2-позитивних клітинних ліній, які можуть використовуватися для характеристики ефектів IMAB362 *in vitro* і *in vivo*, проводили скринінг комплексу з 26 комерційно доступних ракових ліній підшлункової залози на експресію CLDN18.2 і їх докладну характеристику. Для кожної лінії клітин відразу після прибуття готували банк клітин для експериментального використання. Вони походили з первинних аденокарцином підшлункової залози (10, з них 6 - слизуваті аденокарциноми), первинних карцином (4), метастазів аденокарциноми підшлункової залози в печінці (5) або селезінці (1), або були виділені з асцитної рідини (5) (див. таблицю 16). Деякі із цих клітинних ліній (8) зазнали лентівірусної трансдукції для експресії CLDN18.2.

Таблиця 16

Відомості про походження й характеристики клітинних ліній підшлункової залози

Лінія клітин	Поста-чаль-ник <sup>1</sup>	Поход-ження <sup>2</sup> від лю-дини	Ріст in vivo		Додаткова інформація	Клітинні продукти <sup>3</sup>	Посилання
			п/к пух-лини	мета-стази			
AsPC1	ATCC	AS, ADCA	так	тільки після орто-топічної транс-плантації або ін'єкції в селезінку в SCID і NOG	орто-топічно: метастази в кишечнику, нирках і очеревині; в селезінці: метастази в печінці	СЕА, раковий антиген підшлункової залози, специфічний антиген підшлункової залози, муцин	Chen WH et al., In Vitro 18:24-34 (1982); Tan and Chu et al., Tumor Biol 6:89-98 (1985)
BxPC3	ATCC	PT, ADCA	так	тільки після ін'єкції в селезінку в NOG, але не в Nu/Nu або NOD/SCID	негативна за транс-мембранним регулятором провідності типу кистозного фіброзу (CFTR)	СЕА, раковий антиген підшлункової залози, специфічний антиген підшлункової залози, муцин	Tan MH et al., Cancer Invest. 4:15-23 (1986); Suemizu et al., Int. J. Oncol. 31:741 (2007)
BxPC3 (ECACC)	ECACC	PT, ADCA	так		онкогенна на мишах nude, утворює помірно або погано диферент-ційовані пухлини, співрозмірні з первинною адено-карциномою	муцин, СЕА, раковий антиген підшлункової залози, специфічний антиген підшлункової залози	Tan MH et al., Cancer Invest. 4:15-23 (1986)
CAPAN1	DSMZ	LM, D-ADCA	так	після ін'єкції в селезінку в NOG	позитивна за транс-мембранним регулятором провідності типу кистозного фіброзу (CFTR); стійка до 5-FU		Fogh et al., J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214 (1977); Suemizu et al., Int. J. Oncol. 31:741 (2007)

Продовження Таблиці 16

CFPAC1	ATCC	LM, D-ADCA, кистозний фіброз	так	після орто-топічної трансплантації в Nu/Nu	експресує продукт гена CF (кистозний фіброз), клітини мають найпоширенішу форму мутації CF; не діють агоністи цАМФ, стимулятори аденилциклази або інгібітори фосфодіестерази; реагує на $\text{Ca}^{++}$ -іонофори; чутлива до капецитабіну й циклопаміну	СЕА, карцинофетальний антиген, пов'язаний з аденокарциномою антиген, СА19-9, епітетліальні кератини	Schoumacher RA et al., Proc Natl. Acad Sci. USA 87:4012-4016 (1990); Lee et al., Oncogene 2010, 29:56-67; Thayer et al., Nature 2003 425:851
DANG	DSMZ	CA	так	немає			немає публікацій
HPAFII	ATCC	AS, ADCA	так	слабо утворює метастази після орто-топічної трансплантації в SCID	позитивна по IL22-R (інгібує дія NK-клітин через IL10 і TGF- $\beta$ 1)	муцин 1 і муцин 4	Kim YW et al., Pancreas 4:353-362 (1989); Curd et al., Clin. Exp. Immunol. 168 (2012)

Продовження Таблиці 16

HPAC	ATCC	ADCA	так	слабо утворює метастази після ортотопічної трансплантації в SCID	отримана з голівки підшлункової залози; пухлини в мишей nude гістологічно подібні вихідної пухлини; ріст стимулюється інсуліном, IGF-I, EGF і TGF; ріст пригнічується дексаметазоном і глюкокортикоїдами	EGF, функціональний глюкокортикоїдний рецептор, кератин, маркер епітелію проток підшлункової залози (DU-PAN-2), антигени (HMFG1, AUA1), ракові антигени (CEA, CA-125, CA19-9)	Gower WJ et al., In vitro Cell Dev Biol 30A:151-161 (1994)
HUP-T3	DSMZ	AS, CA			з погано диференційованої ADCA	невеликі кількості CEA, TGF- $\beta$ 2	Nishimura et al., Int. J. Pancreatol 13:31-41 (1993)
HUP-T4	DSMZ	AS, CA			з добре диференційованої папілярної ADCA	більші кількості CEA і CA19-9, TGF- $\beta$ 2	Nishimura et al. Int. J. Pancreatol 13:31-41 (1993); Schlingensiepen et al., Antisense Pharma GmbH
KCI-MOH	DSMZ	PT-ADCA	так (SCID)		отримана з голівки підшлункової залози; помірно диференційована, трубчаста	цитокератини	Mohammad et al., Pancreas 16: 19-25 (1998)

Продовження Таблиці 16

KP-2	JCRB	D-ADCA	Так	(міні-мальноно)	помірно диференційована; при трансплантації мишам nude гістологічно подібні вихідної пухлини; утворює метастази мінімально		Ikeda et al., J Cancer Res. 81:987-993 (1990)
KP-4	JCRB	D-CA	так	сильно		пептид, родинний паратгормону (Pthrp)	Nishi et al., Int. J. Oncol. 5: 33-39 (1994)
MiaPaCa2	JCRB	PT-CA	так	немає	недиференційована, чутлива до аспарагінази		Yunis et al., Int. J. Cancer 19: 218-235 (1977)
Panc01	ATCC	PT, D-E-CA	так (NOD/SCID, NOG)	так, після ін'єкції в селезінку в NOG			Suemizu et al., Int. J. Oncol. 31: 741 (2007)
Panc02.03	ATCC	PT, ADCA	так (nude/SCID)		отримана з голівки підшлункової залози; онкогенна мутація K-ras	цитокератини	Jaffee et al., Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998)
Panc03.27	ATCC	PT, ADCA	так (nude/SCID)		отримана з голівки підшлункової залози; K-ras дикого типу	цитокератини	Jaffee et al., Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998)
Panc04.03	ATCC	PT, ADCA	так (nude/SCID)		отримана з голівки підшлункової залози; онкогенна мутація K-ras	цитокератини	Jaffee et al., Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998)

Продовження Таблиці 16

Panc05.04	ATCC	PT, ADCA	тільки при трансплантації в матригелі		отримана з голівки підшлункової залози; онкогенна мутація K-ras; п/ш пухлини чутливі до циклопаміну	цитокератини	Jaffee et al., Cancer J. Sci. Am. 4: 194-203 (1998); Thayer et al., Nature 2003 425:851
Patu8902	DSMZ	PT, D-ADCA	так	так	стадія II	секретує протеїнази й катепсин В, експресує TGF- $\beta$ 2	Elsasser et al., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 64: 201 (1993)
Patu8988S	ATCC	LM, ADCA	так	тільки в легенях	недиференційовані тверді пухлини в мишей	цитокератини, а муцина немає	Elsasser et al., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61:295-306 (1992)
Patu8988T	ATCC	LM, ADCA	так	немає	диференційовані пухлини в мишей із трубчастими структурами (це сестрина лінія Patu8988S); не утворює метастази у мишей	сильна секреція муцина, цитокератини	Elsasser et al., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61:295-306 (1992)
Suit-2	HSRRB	LM, T-ADCA	так	сильно	помірно диференційована, трубчаста, епітеліоподібна; сильно утворює метастази у мишей nude	CEA, CA19-9	Ywamura T. et al.
Su86.86	ATCC	LM, D-ADCA	так (орто-топічно)		клітини можуть лізуватися Lak-клітинами в присутності IL-2, але не NK-клітинами	CEA	Drucker BJ et al., In vitro Cell Dev Biol. 24: 1179-1187 (1988)



SW1990	ATCC	SM, ADCA	так		стадія II, отримана з екзокринної частини підшлункової залози, епітеліальна, пухлини в мишей nude подібні до вихідної пухлини, морфологія типу протоків	муцин, CEA	Kyriazis AP et al., Cancer Res. 43:4393-4401 (1983)
YPAC	DSMZ	AS, CA	так	так	утворює пухлини в мишей nude з функціональними характеристиками вихідної пухлини	секретує запальні цитокіни, IL1 $\alpha$ (аутокринно), IL-6, IL8	Yamada et al., Int J Cancer, 76:141, (1998)

<sup>1</sup> ATCC: American Type Culture Collection; HSRB: Health Science Research Resources Bank; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

<sup>2</sup> PT: первинна пухлина; AS: асцити; LM: метастази в печінці; SM: метастази в селезінці; ADCA: аденокарцинома; D: проток; T: трубчаста; E: епітеліоїдна; CA: карцинома підшлункової залози

<sup>3</sup> CEA: карциноємбріональний антиген; CA: вуглеводний антиген; IL: інтерлейкін.

Експресія транскрипта CLDN18.2 у ракових лініях клітин підшлункової залози людини

Для ідентифікації які експресують CLDN18.2 ліній клітин підшлункової залози визначали рівні транскриптів методом кількісної ПЛР у реальному часі (RT-PCR), використовуючи прямий праймер, що зв'язується з екзоном-1 CLDN18.2, і зворотний праймер, що зв'язується з екзоном-3 CLDN18. Як позитивний й негативний контроль, відповідно, включали лінію клітин карциноми шлунка людини KATO-III, яка ендогенно експресує CLDN18.2 і негативну за CLDN18.2 лінію ракових клітин молочної залози SKBR-3. ПЛР у реальному часі показав чітку ендогенну експресію CLDN18.2 у ракових лініях клітин підшлункової залози DANG, Panc03.27, Panc05.04, Patu8988S і YAPC, при цьому відносний рівень перевищував  $1 \times 10^5$ . Цікаво, що клітини Patu8988S проявляли рівень експресії CLDN18.2 ( $\sim 1 \times 10^8$ ), порівняний із клітинами CA шлунка KATO-III (Фіг. 12A). Таким чином, ми виявили сильну експресію CLDN18.2 в 5 з 22 ліній ракових клітин підшлункової залози.

Поряд з ендогенними лініями клітин, аналізували на рівні транскрипта LVT-лінії клітин, ектопічно які експресують CLDN18.2 (Фіг. 12A). В 6 з 8 LVT-ліній клітин відносні рівні експресії CLDN18.2 становили більш  $1 \times 10^8$ . Тільки в клітинах HAPC-LVT і Suit2-LVT рівень експресії був вище  $1 \times 10^5$ .

Далі досліджували, чи буде експресія CLDN18.2 стабільною при культивуванні in vitro. Клітини Patu8988S, Panc05.04 і трансдуковані лентівірусом лінії клітин Suit2-LVT, MiaPaCa2-LVT і Patu8902-LVT пересейвали аж до 15 раз і проводили аналіз на траскрипти CLDN18.2 (Фіг. 12B-D). При великій кількості пересівань як в ендогенних, так і в трансдукованих клітинах спостерігалася втрата експресії CLDN18.2. Втрата експресії була найвищою в трансдукованих клітинах. Тому для експериментів in vitro використовували ранні пересівання, де це можливо, а в наведених нижче експериментах з приживлення перевіряли експресію CLDN18.2 у привитих пухлинах.

Експресія білка CLDN18.2 у ракових лініях клітин підшлункової залози людини

Виявлення CLDN18.2 у лізатах клітин

На додачу до аналізу транскриптів, аналізували експресію CLDN18.2 на рівні білка методами вестерн-блотинга й IF. При вестерн-блотингу досліджували клітинні лізати 26 ліній клітин підшлункової залози методом вестерн-блотинга (WB) з використанням специфічного до CLDN18 антитіла проти клаудину 18 (С-кінець). Знову ж як негативного контролю використовували лізати клітин SKBR-3, а як позитивний контроль - лізати клітин HEK293, стабільно трансфікованих CLDN18.2 (HEK293-p740). При цьому відзначалася сильна експресія білка в клітинах Patu8988S, DANG і Panc05.04, що підтверджує дані по РНК. У лізатах клітин Panc03.27 і BxPC3 проявлялися слабкі смуги. Клітини YAPC, які були позитивними на рівні РНК, проявляли слабку смугу меншого розміру на вестерн-блотах. Усі інші клітинні лінії були негативними (Фіг. 13).

Клітинна експресія CLDN18 у ракових клітинах підшлункової залози

Для одержання даних, що підтверджують експресію білка, клітинні лінії карциноми підшлункової залози досліджували методом імуофлуоресценції (IF) після фіксації й пермеабілізації клітин, використовуючи для детектування антитіло 35-22A. Аналіз методом IF підтвердив колишні дані по РНК і білку, що показують, що більшість ракових ліній клітин підшлункової залози негативні по фарбуванню на CLDN18.2 (Фіг. 14). У деяких клітинних лініях (типу AsPC1, DANG, HUP-T3, T4-HUP, Panc01) спостерігалися цятки в ядрах, які, швидше за все, є артефактами фарбування. Клітини DANG, Panc03.27 і BxPC3, які проявляли низькі рівні CLDN18.2 на рівні РНК і/або білка, були негативними й при IF-аналізі, який має меншу чутливість. Напроти, у контрольних клітин карциноми шлунка Panc05.04, Patu8988S і KATO-III мембрани й цитоплазма давали сильне позитивне фарбування на CLDN18.2. Інтенсивність фарбування була різною в різних клітин, а в популяції також відзначалися негативні клітини (Фіг. 14J і N). В LVT-ліній клітин сильне фарбування мембран відзначалося в більш ніж 80 % клітин.

Підтвердження експресії CLDN18.2 у ракових клітинах підшлункової залози

Для підтвердження експресії CLDN18.2 і оцінки кількості цієї мішені на клітинній поверхні, ендогенні лінії клітин Panc05.04 і Patu8988S, а також LVT-лінії клітин піддавали фарбуванню за допомогою IMAB362 по нативної методики фарбування. Хоча фарбування IMAB362 контрольних ракових клітин шлунка Patu8988S, Panc05.04 і KATO-III було менш інтенсивним і відсоток позитивних клітин знижувався в порівнянні з фарбуванням клітин 35-22A (Фіг. 16A-F), аналіз методом IF підтвердив, що CLDN18.2 експресується на поверхні ракових клітин підшлункової залози. В 8 LVT-ліній ракових клітин підшлункової залози, ектопічно які експресують CLDN18.2, спостерігалася чітке фарбування мембран майже на всіх клітинах (як це видно в 6 LVT-ліній клітин на Фіг. 16G-L).

Таким чином, аналіз експресії CLDN18.2 привів до ідентифікації ліній ракових клітин підшлункової залози, які ендогенно експресують Panc05.04 і Patu8988S і всіх 8 трансдукованих лентівірусом клітинних ліній BxPC3-LVT, CAPAN1-LVT, DANG-LVT, MiaPaCa-2-LVT, Suit2-LVT, Patu8902-LVT і YAPC-LVT як придатних для моделювання систем CLDN18.2-позитивних клітин.

Розробка моделей ксенотрансплантації й утворення метастазів рака підшлункової залози

Дослідження із приживання для ідентифікації придатних моделей підшкірних пухлин при раку підшлункової залози

У цілому проводили 37 досліджень із приживлення з різними лініями ракових клітин підшлункової залози для ідентифікації придатних підшкірних моделей ксенотрансплантації для тестування ефективності IMAB362 in vivo. Із усіх досліджених клітинних ліній для підшкірних моделей ксенотрансплантації були відібрані лінії клітин BxPC3-LVT, CAPAN1-LVT, MiaPaCa-2-LVT, HPAC-LVT, DANG-LVT і YAPC-LVT з ектопічною експресією CLDN18.2, що проявляють високий ступінь приживання й однорідний ріст пухлин. Крім того, для тестування ефективності IMAB362 in vivo були обрані підшкірні моделі ксенотрансплантації з ендогенно які експресують CLDN18.2 лініями клітин Patu8988S і DANG. Підшкірне введення клітин Panc05.04 не призводило до утворення підшкірних пухлин.

Таблиця 17

Зведення із тестування умов приживання для розробки підшкірних моделей  
ксенотрансплантації рака підшлункової залози

Лінія клітин	Перевірка приживання (EC)	Дата	Постановка експерименту	Результати	Примітки
BxPC3 ATCC	EC1_BxPC3 ATCC	22.03.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 40 %; тривалість життя в середньому 56 днів	не рекомен-дується
BxPC3 ECACC	EC2_BxPC3 ECACC	23.03.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 63 дня	придатні умови для підшкірної ксенотранс-плантації
BxPC3-LVT	EC3_C179	25.03.2011	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 90 %; тривалість життя в середньому 64 дня	придатні умови для підшкірної ксенотранс-плантації
CAPAN1	EC1_CAPAN1	26.03.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 52 дня	придатні умови для підшкірної ксенотранс-плантації
CAPAN1-LVT	EC1_C186	09.08.2011	аналіз утворення метастаз: 1-2×10 <sup>6</sup> клітин в PBS в/в 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	немає метастазів у легенів і печінки; аналіз через 72 дня після введення ракових клітин	не рекомен-дується
CAPAN2	EC1_CAPAN2	06.04.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 100 днів	придатні умови для підшкірної ксенотранс-плантації
DANG	EC3_C2	08.02.2007	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 3 безтімусним мишам	приживання 100 %; дуже агресивний ріст пухлин; тривалість життя в середньому 18 днів	неадекватні умови для моделі ксенотранс-плантації
DANG	EC4_C2	10.10.2007	5×10 <sup>5</sup> -1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 25 безтімусним мишам	приживання 100 %; дуже агресивний ріст пухлин; тривалість життя 16-23 дня	неадекватні умови для моделі ксенотранс-плантації

Продовження Таблиці 17

DANG субклон 1C5F2	EC5_C2	01.06.2010	2,5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; кахексія в мишей з пухлинами; тривалість життя в середньому 17 днів	не рекомен- дується через ракову кахексію
DANG субклон 1C5F2	EC6_C2	10.02.2011	5×10 <sup>4</sup> -2×10 <sup>5</sup> клітин підшкірно в лівий бік 15 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	5×10 <sup>4</sup> = 40 % приживання; 1×10 <sup>5</sup> , 2×10 <sup>5</sup> = 100 % приживання; тривалість життя 26-39 днів	не рекомен- дується через ракову кахексію
DANG субклон 1C5F2	EC7_C2	02.04.2011	2×10 <sup>5</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам і 5 самцям мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup> ; кінетика ваги	приживання 100 %; кахексія в мишей з пухлинами; тривалість життя в середньому 29 днів	не рекомен- дується через ракову кахексію
DANG-LVT	EC1_C180	21.03.2011	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; кахексія в мишей з пухлинами; тривалість життя в середньому 28 днів	не рекомен- дується через ракову кахексію
Patu8902	EC1_C197	25.07.2011	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; швидкий ріст пухлин; тривалість життя в середньому 21 день	придатні умови для моделі ксенотранс- плантації
Patu8902	EC2_C197	25.07.2011	експери- ментальний аналіз метастазів: в/в уведення 1-2×10 <sup>6</sup> клітин 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	немає метастазів у тканинах легенів і печінки; 8 мишей умерло після введення ракових клітин	не рекомен- дується для аналізу метастазів
Patu8988S	EC1_C178	15.03.2011	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; неоднорідний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 55 днів	не рекомен- дується

Продовження Таблиці 17

Patu8988S	EC2_C178	05.04.2011	експериментальний аналіз метастазів: в/в уведення $1-2 \times 10^6$ клітин 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	дуже повільна модель метастазів; аналіз через 70 днів	придатна модель для аналізу метастазів у легенях
Patu8988S	EC3_C178	10.06.2011	$2,5 \times 10^6 - 1,5 \times 10^7$ клітин підшкірно в лівий бік 15 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 95,5 днів	не рекомендується
Patu8988S (рекульт.)	EC1_C202	11.08.2011	$5 \times 10^6$ клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 88 днів	не рекомендується
Patu8988S субклон 17	EC1_C214	28.11.2011	$5 \times 10^6$ клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 54 днів	не рекомендується
Patu8988S субклон 22	EC1_C215	28.11.2011	$5 \times 10^6$ клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100%; неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 47 днів	не рекомендується через неоднорідність і виразки пухлин; найкращі криві росту із усіх субклонів Patu8988S
Patu8988S субклон 30	EC1_C216	28.11.2011	$5 \times 10^6$ клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 35 днів	не рекомендується

Продовження Таблиці 17

Patu8988S субклон 34	EC1_C217	28.11.2011	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 49 днів	не рекомен- дується
Patu8988S субклон 41	EC1_C218	28.11.2011	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 108 днів	не рекомен- дується
Patu8988S субклон adm#13	EC1_C237	06.02.2012	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	повільний ріст пухлин; криваві кісти, але без виразки; тривалість життя в середньому 73 дня	прийнятна модель для підшкірної ксенотранс- плантації
Patu8988S субклон adm#19	EC1_C238	06.02.2012	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 42 дня	не рекомен- дується
Patu8988S субклон adm#1	EC1_C239	13.02.2012	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	неоднорідний ріст пухлин; повільний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 77 днів	не рекомен- дується
Patu8988S субклон adm#16	EC1_C240	13.02.2012	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	повільний ріст пухлин; криваві кісти, але без виразки; тривалість життя в середньому 66 дня	прийнятна модель для підшкірної ксенотранс- плантації

Продовження Таблиці 17

Patu8988S субклон adm#9	EC1_C241	13.02.2012	5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	повільний ріст пухлин; криваві кісти, але без виразки; тривалість життя в середньому 59 днів	прийнятна модель для підшкірної ксенотранс- плантації
Suit2	EC1_C196	25.07.2011	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; швидкий ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 35 днів	не рекомен- дується
Suit2	EC2_C196	25.07.2011	експери- ментальний аналіз метастазів: в/в уведення 2×10 <sup>6</sup> клітин 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	метастази в легенів, печінки й м'язах	придатна модель для аналізу метастазів у легенях
Panc02.03	EC1_Panc 02.03	12.05.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 54 дня	придатні умови для моделі підшкірної ксенотранс- плантації
Panc03.27	EC2_Panc 03.27	12.05.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 91 день	придатні умови для моделі підшкірної ксено- трансп- плантації
Panc04.03	EC3_Panc 04.03	17.06.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 39 днів	придатні умови для моделі підшкірної ксенотранс- плантації
Panc05.04	EC4_Panc 05.04	18.06.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	не відзначене росту підшкірних пухлин	не рекомен- дується
Panc05.04	EC5_Panc 05.04	09.05.2011	2×10 <sup>7</sup> клітин в RPMI підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI- Foxn1 <sup>nu</sup>	не відзначене росту підшкірних пухлин	не рекомен- дується

Продовження Таблиці 17

MiaPaCa2	EC1_C195	25.07.2011	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 42 дня	придатні умови для моделі підшкірної ксенотранс-плантації
MiaPaCa2-LVT	EC1_C219	18.11.2011	5×10 <sup>6</sup> або 1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 40 днів	придатні умови для моделі підшкірної ксенотранс-плантації
MiaPaCa2	EC2_C195	25.07.2011	експериментальний аналіз метастазів: в/в уведення 2×10 <sup>6</sup> клітин 10 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	метастази в легенів, печінки й лімфатичних вузлах	придатна модель для аналізу метастазів у легенях
HPAC	EC1_HPAC	19.04.2010	1,5×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; тривалість життя в середньому 29 днів	придатні умови для моделі підшкірної ксенотранс-плантації
YAPC	EC1_YAPC	10.05.2010	1×10 <sup>7</sup> клітин підшкірно в лівий бік 5 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; дуже агресивний ріст пухлин; однорідний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 28 днів	обмежена модель ксенотранс-плантації
YAPC-LVT	EC2_YAPC	10.05.2010	5×10 <sup>5</sup> -7,5×10 <sup>6</sup> клітин підшкірно в лівий бік 20 самкам мишей HsdCpb: NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	приживання 100 %; дуже агресивний ріст пухлин; однорідний ріст пухлин; виразка пухлин; тривалість життя в середньому 27 днів	обмежена модель ксенотранс-плантації

Дослідження із приживання для ідентифікації придатних моделей утворення метастазів

- 5 Для вивчення ефектів IMAB362 на утворення метастаз були поставлені моделі утворення метастаз рака на мишах nude. Клітини ракових ліній підшлункової залози піддавали аналізу на їхню здатність до утворення метастаз після в/в уведення. Клітини CAPAN1-LVT, MiaPaCa-2, Patu8988S, Patu8902 і Suit-2 вводили у хвостову вену мишей nude, як описано в Mohanty and Xu, 2010. Для визначення моменту часу приживання й швидкості росту метастазів мишей забивали в різні моменти часу (таблиця 18).

10



Аналіз приживання метастазів з ракових ліній клітин підшлункової залози

Лінія клітин	Кіл-ть клітин	Кіл-ть мишей	У який день проводили аналіз мишей (кіл-ть)	У який день гинули миші (кіл-ть)	Які органи виділяли	Мета-стази
Patu8902	1×10 <sup>6</sup>	5	-	0(1), 1(3), 4(1)	н/з	немає
Patu8902	2×10 <sup>6</sup>	5	-	0(1), 1(3), 15(1)	н/з	немає
Patu8988S	1×10 <sup>6</sup>	7	34, 51, 59, 66, 70, 86, 108	-	легені й печінка	у легенях
Patu8988S	2×10 <sup>6</sup>	8	34, 41, 51, 59, 66, 70, 86, 108	-	легені й печінка	у легенях
Suit-2	2×10 <sup>6</sup>	10	36(3), 45(3), 52(2), 59(2)	-	легені й печінка	у легенях і печінці
CAPAN1-LVT	2×10 <sup>6</sup>	5	72(1)	0(1), 1(3)	н/з	н/з
CAPAN1-LVT	1×10 <sup>6</sup>	5	72(4)	2(1)	легені й печінка	н/з
MiaPaCa-2	2×10 <sup>6</sup>	10	32(2), 52(2), 59(2), 66(2), 73(2)	-	легені й печінка	немає

Аналіз приживання клітин Patu8902 і CAPAN1-LVT був неможливий, тому що більшість мишей гинула майже відразу. У легенях і печінці 5 мишей, що вижили, які одержували клітини CAPAN-LVT, через 72 дні не було виявлено макроскопічно видимих метастазів. Напроти, введення клітин Suit-2 і MiaPaCa-2 добре переносилося. Тканини легень цих мишей піддавали аналізу методом ІНС у різні моменти часу після ін'єкції. У мишей, що одержували клітини MiaPaCa-2, не відзначалося метастазів у легенях і через 73 дня, тому ця лінія клітин не була обрана як модель для обробки IMAB362. Ракові клітини Suit-2 давали метастази в легені мишей. Відзначалися множинні вогнища по всій тканині. Саме тому трансдукована лентівірусним CLDN18.2 лінія клітин Suit-2-LVT була обраний як модельної системи для аналізу ефектів застосування IMAB362 на утворення метастаз.

Поряд з Suit-2, також аналізували здатність до утворення метастазів у клітин Patu8988S, ендогенно які експресують CLDN18.2. Перевірку на приживання проводили при внутрішньовенному введенні мишам 2 різних кількостей клітин (1×10<sup>6</sup>, 2×10<sup>6</sup>). У різні моменти часу виділяли легені й печінку, як зазначено в таблиці 18. Спочатку різні отримані тканини піддавали аналізу методом к-ПЛР. Легені й печінку, отримані до 70-го дня, аналізували шляхом ампліфікації  $\alpha$ -сателітної ДНК із хромосоми 17 людини. Результати на легенях показали чітке зростання вмісту ДНК людини в легенях миші за часом, який не залежав від кількості введених клітин. При внутрішньовенному введенні 1×10<sup>6</sup> або 2×10<sup>6</sup> клітин через 70 днів відзначалося 5,8 % і 3,7 % ДНК людини, відповідно (Фіг. 19). У печінці ДНК людини майже не ампліфікувалась. Через 70 днів її вміст злегка підвищувався, але усе ще було менше 0,005 %.

Для перевірки експресії CLDN18.2 у метастазах Patu8988S піддавали тканини легень імуногістохімічному фарбуванню за допомогою антитіл проти МНС класу І людини для виявлення клітин людини в тканинах миші, а також антитіла проти клаудину 18 (Mid). Фарбування на МНС-І показало, що в мишей відзначаються чіткі вогнища метастазів на зрізах тканини легень, але не на зрізах печінки (Фіг. 20). Більше того, мембрани клітин у цих вогнищах фарбувалися антитілом проти клаудину 18 (Mid), що чітко свідчить про експресію білка мішені IMAB362 у цих клітинах. Тому ця модель ендогенних метастазів була обрана для дослідження застосування IMAB362 поряд з моделлю Suit2-LVT.

Приклад 4. Опосередковані IMAB362 ефекти знищення клітин

Передресне зшивання IMAB362 викликає ефективний апоптоз

Зв'язування антитіл із клітинною поверхнею мішені може запускати аномальну передачу сигналів, що приводить безпосередньо до загибелі клітин. Такі сигнальні події можуть залежати від епітопа мішені, валентності зв'язування й того, чи асоційоване зв'язування з передресним зшиванням мішені. Наприклад, індукція апоптоза ритуксимабом у декількох CD 20-позитивних клітинних ліній лімфоми спостерігається тільки за умови передресного зшивання. Таке зшивання може відбуватися in vivo при високоафінній взаємодії позитивних за Fc-рецепторами імунних клітин з покритими антитілом пухлинними клітинами.

Передресне зшивання IMAB362 викликає апоптоз прямо в межах 18-42 годин у ракових клітинах шлунка людини NUGC-4 і KATO-III при визначенні методом TUNEL. Ступінь апоптоза

корелює з дозою антитіла й рівнем експресії мішені в ракових клітинах. Обробка гемцитабіном приводить до зупинки клітинного циклу ракових клітин з наступним апоптозом клітин. Апоптоз оброблених гемцитабіном пухлинних клітин підшлункової залози представлений на Фіг. 21.

Опосередкована IMAB362 активність ADCC проти ракових клітин підшлункової залози

IMAB362 дуже дієво викликає рекрутинг і активацію позитивних по Fc $\gamma$ -Рецептору імунних ефекторних клітин, таких як клітини нормальних кілерів. Зв'язування IMAB362 із клітинами мішені викликає антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) під дією гранзимів і перфоринів, секретуємих ефекторними клітинами при зв'язуванні їх Fc $\gamma$ -Рецепторів з антитілом. Раніше був показаний вплив цього механізму дії на позитивні за люциферазою й CLDN18.2 клітини СА шлунка (типу NUGC-4 і KATO-III) при інкубації з IMAB362 протягом 24 годин у присутності мононуклеарів периферійної крові людини (PBMС) (співвідношення ефектор:мішень = 40:1). Застосування до 200 мкг/мл IMAB362 давало максимальний ступінь лізису в 80-100 %.

Тут ми визначали ADCC-активність IMAB362 проти ракових ліній клітин підшлункової залози. IMAB362 у зростаючих концентраціях інкубували з різними лініями клітин при співвідношенні Е:Т = 40:1. У кожному експерименті додавали PBMС від різних донорів. Результати для всіх клітинних ліній наведено в таблиці 19. З 5 спочатку виявлених CLDN18.2-позитивних ліній клітин підшлункової залози тільки Patu8988S, Panc05.04 і DANG ефективно гинули при додаванні IMAB362 і PBMС (Фіг. 22A). Хоча поверхнева експресія CLDN18.2 в Panc05.04 і DANG не виявлялася методом FACS, рівень експресії був досить значним, щоб викликати залежне від ефекторних клітин знищення (EC<sub>50</sub>: Patu8988S: 0,01-1,4 мкг/мл, DANG/Pan05.04: 0,1-38 мкг/мл). Із цих даних можна зробити висновок, що ефективно лізуються тільки клітини, які експресують РНК на відносному рівні >5,5 $\times$ 10<sup>5</sup>.

Аналіз ADCC також проводили з LVT-лініями ракових клітин підшлункової залози й відповідними вихідними лініями клітин (Фіг. 22B-F). ADCC строго залежить від специфічного зв'язування IMAB362 з мішенню, тому що тільки CLDN18.2-позитивні клітини мішені знищуються IMAB362 і PBMС. Напівмаксимальне знищення й максимальний ступінь знищення ракових клітин підшлункової залози людини під дією IMAB362 варіювалася між донорами PBMС, а також залежала від кількості пересівань клітин, що впливає на рівень експресії CLDN18.2.

Концентрації IMAB362, що викликають напівмаксимальне знищення клітин мішені, а також максимальний ступінь знищення представлені на Фіг. 22G-H. LVT-лінії клітин СА підшлункової залози гинули при додаванні невеликих кількостей антитіла у великому ступені, тоді як для DANG і Panc05 потрібні найвищі концентрації антитіла для досягнення ступеня знищення ~50 % від максимальної. На фігурі також представлені результати для Panc05.04, отримані із субклоном 15D3 (CLDN18.2-позитивний клон, відібраний методом серійних розведень Panc05.04 і FACS), який проявляв порівнянну з LVT-лініями клітин ступінь викликаного ADCC лізису. На жаль, експресія CLDN18.2 у цього клону швидко затихала *in vitro* після пересівання клітин, тому цей клон не використовувався для подальших експериментів.

Опосередкована IMAB362 активність CDC проти ракових клітин підшлункової залози

Раківі клітини підшлункової залози, які знищувалися IMAB362 при аналізі ADCC, піддавали аналізу на їхню чутливість до комплементзалежної літичної активності IMAB362. Крім того, тестували на CDC і LVT-лінії клітин і їх вихідні штами.

Активність CDC активується комплексами антигену з антитілами типу IgM або IgG (класичний шлях) або поверхнями мікроорганізмів (альтернативний шлях). У класичному шляху комплемент I35 перетворюється в C5b. При послідовнім зв'язуванні C5b, C7, C8 і C9 вивільняються анафілотоксини C3a, C4a і C5b і утворюється мембраноатакуючий комплекс (MAC). Цей шлях пригнічується як розчинними, так і мембранозв'язаними білками (наприклад, CR1, DAF, MCP, CD59, CD55, CD46), що захищають свої тканини.

Як позитивних контролів при кожному аналізі використовували клітини CHO-K1, стабільно трансфіковані CLDN18.2 (p740) і люциферазою (Фіг. 23A). Лінії клітин DANG, BxPC3, YAPC, Patu8988S, Panc05.04, CAPAN1 і Suit-2 не зазнали лізису при додаванні IMAB362 і збірні сироватки здорової людини (Фіг. 23B). Хоча клітини DANG, Patu8988S і Panc05.04 є CLDN18.2-позитивними, як було показано у всіх попередніх експериментах, однак вони не лізуються комплементзалежним чином. Швидше за все, це пов'язане з тим, що ракові клітини гіперекспресують один або кілька білків, які інгібують мембранозв'язаний комплемент (наприклад, CD46, CD55 і CD59) (Geis et al., Curr Cancer Drug Targets 2010, 10:922-931). Однак усе ще залишається неясним, чи впливає експресія цих інгібіторних білків у пухлинних клітинах на клінічний результат терапії антитілами (Dzietczenia et al., Med. Oncol. 2010, 27:743-6; Weng and Levy et al., Blood 2001, 98:1352-7).

Поряд з ендегенними лініями клітин, тестували на CDC і всі LVT-лінії клітин. Як видно з Фіг. 23, додавання IMAB362 і сироватки до клітин MiaPaCa-2-LVT, Suit2-LVT і CAPAN1-LVT

викликало дозозалежний лізис зі значеннями EC<sub>50</sub> від 0,3 до 2,6 мкг/мл.

Зведення по експресії CLDN18.2 у клітинах ракових ліній підшлункової залози людини

Таблиця 19

Отримані in vitro і in vivo характеристики ракових ліній клітин підшлункової залози

Лінія клітин	Рівень мРНК CLDN 18.2 (RT-ПЛР)	Рівень білка CLDN 18 (WB) <sup>1</sup>	Поверхн. експресія CLDN 18.2 (FACS) <sup>2</sup>	Клітинна локалізація CLDN 18.2 (IF) <sup>3</sup>	ADCC <sup>4</sup>		CDC		Чи годиться для дослідів із застосуванням ІМАВ362
					Макс. лізис (%)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	Макс. лізис (%)	EC <sub>50</sub> (нг/мл)	
AsPC1	2,0×10 <sup>1</sup>	-	0,14 %	цитоплазма плями в ядрі	н.з.	н.з.	н.в.	н.в.	немає
BxPC3 (ATCC)	4,3×10 <sup>4</sup>	-	1,16 %	н.в.	н.з.	н.з.	н.в.	н.в.	немає
BxPC3 (ECACC)	2,9×10 <sup>4</sup>	+	0,90 %	цитоплазма	н.з.-60	н.з.	н.в.	н.в.	клітини приживаються, можна використовувати після LVT для застосування in vivo
BxPC3-LVT	6,1×10 <sup>7</sup>	+++		цитоплазма + мембрана	90,6 ± 6,4	47,7 ± 19,1	н.з.	н.з.	клітини приживаються, їх можна використовувати для застосування in vivo
CAPAN1	8,0×10 <sup>2</sup>	-	0,54 %	негатив. <sup>2</sup>	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.	клітини приживаються, можна використовувати після LVT для застосування in vivo
CAPAN1-LVT	1,5×10 <sup>5</sup>	+++		цитоплазма + мембрана	92,6 ± 5,5	65,0 ± 35,1	79,1	970,1	клітини приживаються, їх можна використовувати для застосування in vivo
CFPAC1	1,5×10 <sup>4</sup>	-	0,55 %	негатив.	0-1,5	н.з.	н.в.	н.в.	немає

Продовження Таблиці 19

DANG	$4,9 \times 10^5$	++	1,19 %	цитоплазма плями в ядрі	$52,5 \pm 7,8$	$4976,5 \pm 4125,4$	н.з.	н.з.	клітини прижи- ваються, їх можна використо- вувати для застосу- вання in vivo (недолік: кахексія)
DANG- LVT	$1,8 \times 10^8$	+++		цитоплазма + мем- брана	$85,9 \pm 11,7$	$52,3 \pm 27,7$	н.з.	н.з.	клітини прижи- ваються, їх можна використо- вувати для застосу- вання in vivo
HPAFII	$4,2 \times 10^3$	-	10,00 %	негатив.	н.з.	н.з.	н.в.	н.в.	не вдається відібрати окремі клони (недолік: кахексія)
HPAC	$3,6 \times 10^1$	-	0,81 %		0-22,2	н.з.- 495,6	н.в.	н.в.	клітини прижи- ваються, можна використо- вувати після LVT для застосу- вання in vivo
HPAC- LVT	$7,0 \times 10^5$	+++		цитоплазма +мем- брана	$76,2 \pm 19,4$	$116,8 \pm 105,4$	н.з.	н.з.	клітини прижи- ваються, їх можна використо- вувати для застосу- вання in vivo
HUP-T3	$1,3 \times 10^4$	-	0,23 %	плями в ядрі	н.з.- 17,7	н.з.	н.в.	н.в.	немає
HUP-T4	$1,1 \times 10^2$	-	5,30 %	плями в ядрі	н.з.	н.з.	н.в.	н.в.	немає
KCI-MON	н.в.	-	н.в.	негатив. <sup>2</sup>	н.з.- 2,8	н.з.	н.в.	н.в.	немає
KP-2	1	-	0,54 %	негатив.	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	немає
KP-4	н.в.	-	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	н.в.	немає

Продовження Таблиці 19

MiaPaCa2	0	-	0,22 %	негатив.	Н.З.- 8,1	Н.З.	Н.З.	Н.З.	клітини прижи- ваються, можна використо- вувати після LVT для застосу- вання in vivo
MiaPaCa2- LVT	1,7×10 <sup>8</sup>	+++		цито- плазма +мем- брана	78,1 ± 6,0	23,4 ± 12,3	78,4	340	клітини прижи- ваються, їх можна використо- вувати для застосу- вання in vivo
Panc01	5,3×10 <sup>1</sup>	-	65,0 %	плями в ядрі	0-4,5	Н.З.	Н.В.	Н.В.	немає
Panc02.03	Н.В.	-	Н.В.	негатив. <sup>2</sup>	Н.З.	Н.З.	Н.В.	Н.В.	немає
Panc03.27	2,7×10 <sup>5</sup>	+	7,30 %	цито- плазма	Н.З.	Н.З.	Н.В.	Н.В.	клітини прижи- ваються, відзна- чається деяке фарбування на CLDN 18.2
Panc04.03	Н.В.	-	1,38 %	негатив. <sup>2</sup>	Н.З.- 41,4	Н.З.	Н.В.	Н.В.	немає
Panc05.04	1,2×10 <sup>5</sup>	++	15,0 %	цито- плазма +мем- брана	67,1 ± 6,8	5728,8 ± 4435,1	Н.З.	Н.З.	не вдається відібрати окремі клони, клітини не прижи- ваються (за стан- дартною методикою)
Patu8902	1,7×10 <sup>3</sup>	-	0,39 %	негатив.	Н.З.- 4,2	Н.З.	Н.З.	Н.З.	клітини прижи- ваються, можна використо- вувати після LVT для застосу- вання in vivo

Продовження Таблиці 19

Patu8902-LVT	$1,6 \times 10^8$	+++		цитоплазма + мембрана	$74,1 \pm 16,4$	$49,2 \pm 86,2$	76,7	291,0	клітини приживаються п/ш, можна використовувати для щеплення метастазів, миші гинуть після в/в уведення
Patu8988 S	$3,9 \times 10^5$	+++	81,70 %	цитоплазма + мембрана	$70,1 \pm 22,1$	$174,8 \pm 137,9$	н.з.	н.з.	клітини приживаються, утворюють неоднорідні пухлини/кісти, можна використовувати для застосування in vivo (для підшкірних пухлин і метастазів)
Patu8988T	$1,5 \times 10^1$	-	6,00 %	плями в ядрі	н.з.-27,54	н.з.-470,5	н.в.	н.в.	немає
Suit2	$1,0 \times 10^4$	-	0,41 %	негатив.	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.	клітини приживаються, можна використовувати після LVT для дослідження метастазів
Suit2-LVT	$2,0 \times 10^8$	+++		цитоплазма + мембрана	$81,2 \pm 7,6$	$73,2 \pm 14,7$	н.з.	н.з.	клітини приживаються п/ш, можна використовувати для дослідження метастазів
Su86.86	$3,2 \times 10^4$	-	1,51 %	негатив.	н.з.-14,8	н.з.-30,4	н.в.	н.в.	немає
SW1990	$1,8 \times 10^1$	-	2,53 %	негатив.	н.з.	н.з.	н.в.	н.в.	немає

Продовження Таблиці 19

YPAС	1,5×10 <sup>5</sup>	(+)	0,23 %	негатив.	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.	клітини прижи-ваються, можна використо-вувати після LVT для застосу-вання in vivo
YAPC-LVT	2,5×10 <sup>8</sup>	+++		цито-плазма + мем-брана	91,5 ± 6,3	29,5 ± 15,7	н.з.	н.з.	клітини прижи-ваються, їх можна використо-вувати для застосу-вання in vivo

<sup>1</sup> з використанням антитіла проти клаудину 18 (С-кін.) (Zymed)

<sup>2</sup> при фарбуванні 2×10<sup>5</sup> клітин на 100 мкл за допомогою 50 мкг/мл IMAВ362

<sup>3</sup> з використанням антитіла 35-22А на фіксовані й пермеабілізованих клітинах

<sup>4</sup> результати отримані як мінімум з 2 донорами; н.з. - не знайдено; н.в. - не визначали.

Приклад 5. Ефективність IMAВ362 на моделях ксенотрансплантації рака підшлункової залози

- 5 Для дослідження ефективності IMAВ362 in vivo було обрано 10 з 41 перевіреної моделі ксенотрансплантації рака підшлункової залози. На моделях ксенотрансплантатів підшлункової залози з високою експресією CLDN18.2, обробка IMAВ362 показала високий протипухлинний ефект. Його досліджували шляхом обробки мишей, що несуть у лівому боці підшкірні ксенотрансплантати ВхРС3-LVT або МіаРаСа-2-LVT. Обробку починали через 3 дні після щеплення пухлин введенням 200 мкг IMAВ362 по 2 рази на тиждень. Миші, що одержували IMAВ362 проявляли істотне інгібування росту пухлин у порівнянні з мишами, що одержували контрольний сольовий розчин. Крім того, пригнічення росту пухлин у мишей, які одержували IMAВ362 приводило до подовження середньої тривалості життя (Фіг. 24 і Фіг. 25). Ефективність IMAВ362 корелює із тривалістю обробки. Якщо обробка IMAВ362 починається в ранніх тимчасових точках, то інгібування росту пухлин підвищується більше, чим при пізньому початку обробки для дослідження дії на пухлини, що прижилися. Більше того, протипухлинний ефект IMAВ362 залежав від ступеня експресії CLDN18.2 у мішені. У пухлин з низькою експресією CLDN18.2 типу ксенотрансплантатів DANG і Patu8988S опосередковане IMAВ362 інгібування росту знижувалося в порівнянні з інгібуванням росту пухлин при ксенотрансплантації пухлин з високою експресією CLDN18.2.

Приклад 6. Обробка на моделях метастазів рака підшлункової залози в мишей

## Зведення із обробки при тестуванні ефективності IMAV362 на метастази раку підшлункової залози

Лінія клітин	№ (дата) експерименту	Дослідні групи	Постановка експерименту
Suit2-LVT	ET2_C220 (22.11.2011)	1. n=15; 200 мкг IMAV362 по 2 рази на тиждень в/в-в/о 2. n=15; 200 мкг ізотипового контролю по 2 рази на тиждень в/в-в/о 3. n=15; PBS по 2 рази на тиждень в/в-в/о	- ін'єкція $2 \times 10^6$ клітин в/в у хвостову вену самкам безтімусних мишей nude Hsd: Foxn1 <sup>nu</sup> - початок обробки через 3 дня після введення ракових клітин
Patu8988S	ET1_C178 (24.05.2011)	1. n=10; 200 мкг IMAV362 по 2 рази на тиждень в/в-в/о 2. n=10; PBS по 2 рази на тиждень в/в-в/о	- ін'єкція $2 \times 10^6$ клітин в/в у хвостову вену самкам безтімусних мишей nude Hsd: Foxn1 <sup>nu</sup> - початок обробки через 3 дня після введення ракових клітин
Patu8988S	ET1_C178b (03.06.2011)	1. n=15; 200 мкг IMAV362 по 2 рази на тиждень в/в-в/о 2. n=15; контроль на ізотип по 2 рази на тиждень в/в-в/о	- ін'єкція $2 \times 10^6$ клітин в/в у хвостову вену самкам безтімусних мишей nude Hsd: Foxn1 <sup>nu</sup> - початок обробки через 3 дня після введення ракових клітин

## Модель метастазів Suit2-LVT

Мишам вводили внутрішньовенно  $2 \times 10^6$  клітин Suit2-LVT і обробляли 200 мкг IMAV362, антитіла з ізотипового контролю (IMAB027) або PBS, як зазначено в таблиці 20. Через 35 днів померла перша миша (група ізотипового контролю). Після цього всіх мишей забивали на 42-й день і видаляли легені й печінку для аналізу методами ІНС і кількісної ПЛР.

Аналіз ДНК людини в легенях мишей методом кількісної ПЛР повторювали щонайменше двічі в трьох повторах. Розрахунки вмісту ДНК людини за отриманими значеннями Ct показали значне зниження ( $p < 0,05$ ) метастазів Suit2-LVT, виявлених у легенях, при обробці мишей IMAV362 (Фіг. 26А) у порівнянні з обробкою PBS і ізотипичним контролем. Для перевірки цих результатів готували зрізи зі зразків тканини легенів і проводили фарбування за допомогою антитіл до МНС-І. Розраховували площу поверхні позитивно пофарбованих клітин на зрізах легенів за допомогою програми ImageJ. При обробці IMAV362 спостерігалось значне інгібування ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з обробкою PBS, підтверджуючи результати, отримані методом к-ПЛР. Однак у випадку антитіла з ізотипового контролю відмінності не були значимі (Фіг. 26В). Ця розбіжність, швидше за все, викликана відмінностями в обробці тканин: обробка зрізів тканин для ІНС забезпечує доступ тільки в дуже невелику ділянку легенів у порівнянні з методом к-ПЛР, для якого екстрагується геномна ДНК із половини тканини.

Поряд з обробкою тканин, можливо, що цей результат представляє несподівані інгібуючі ефекти антитіла з ізотипового контролю проти CLDN6. Для дослідження цієї можливості клітини Suit2-LVT піддавали аналізу на експресію CLDN6 і зв'язування IMAV027 методом FACS. При додаванні 200 мкг/мл IMAV362 до клітин Suit2-LVT проявлялося сильне зв'язування із клітинами, тоді як додавання 200 мкг/мл IMAV027 давало слабе зв'язування антитіла із цими клітинами мішені, указуючи на те, що CLDN6 дійсно слабо експресується в цих клітинах. Ці результати свідчать, що щонайменше два фактори (обробка тканини й слабе інгібування IMAV027) призвели, до спостережуваних розбіжностей з антитілом з ізотипового контролю.

## Модель метастазів Patu8988S

Для аналізу ефекту обробки IMAV362 на розвиток і ріст метастазів Patu8988S in vivo групам по 10 мишей вводили  $2 \times 10^6$  клітин Patu8988S. Перший експеримент проводили шляхом порівняння обробки IMAV362 з обробкою мишей PBS. У кожній групі 1 миша вмирала відразу ж після ін'єкції клітин. В інших 18 мишей метастази виникали дуже швидко в порівнянні з експериментами по приживленню. Через 63 дня забивали перших 2 мишей у групі PBS через поганий стан здоров'я. Усіх інших мишей забивали через 65 днів. Оптичний аналіз легенів



показав великі метастази по всій тканині легенів. Ступінь утворення метастаз аналізували методом кількісної ПЛР (Фіг. 27). Результати показують, що IMAB362 інгібує ріст метастазів у тканині легенів.

Другий експеримент по 11 мишей у кожній групі проводили шляхом порівняння обробки IMAB362 з обробкою ізотипичним контролем (ритуксимаб). У цьому експерименті метастази розвивалися повільно, як це спостерігалось при приживленні. Проте, для порівнянності даних цей другий експеримент теж припиняли через 65 днів. Знову проводили аналіз тканин легенів методом кількісної ПЛР і знову IMAB362 знижував ріст метастазів. Одна миша із групи IMAB362 була встановлена як викид, і виключення цього викиду давало майже значиме ( $p = 0,0588$ ) інгібування. Ці дані перевіряли по площі поверхні методом ІНС, як описано для експерименту з метастазами Suit2-LVT. При цьому проявлявся той же самий викид, і при пропуску цього значення при перевірці Р за t-критерієм інгібування IMAB362 також виявилось на грані значимості ( $p=0,0691$ ), як і значення цієї миші.

Приклад 7. Первинна фармакодинаміка IMAB362 у комбінації з хіміотерапією

Чутливість клітин карциноми підшлункової залози до гемцитабіну й оксаліплатину

Для вивчення механізмів дії IMAB362 у комбінації з хіміотерапевтичними засобами оксаліплатином або гемцитабіном використовували клітини ракових ліній підшлункової залози, конститутивно експресуючі CLDN18.2 (DANG, Patu8988S), і клітини, стабільно трансдуковані CLDN18.2 (MiaPaCa-2-LVT, BxPC3-LVT).

У хімічному відношенні гемцитабін (Gemzar, випускається фірмою Eli Lilly & Co) є аналогом нуклеозидів. Як і 5-фторурацил (5-FU) і інші аналоги піримідинів, трифосфатний аналог гемцитабіну заміняє собою один з будівельних блоків нуклеїнових кислот при реплікації ДНК. Цей процес зупиняє ріст пухлин, тому що до "неправильного" нуклеозиду може приєднуватися тільки ще один нуклеозид, що приводить до апоптозу.

Оксаліплатин функціонує шляхом утворення міжланцюгових і внутрішньоланцюгових перехресних зшивок у ДНК. Перехресні зшивки в ДНК запобігають реплікації й транскрипцію ДНК, що призводить до загибелі клітин (Graham J., Mushin M., Kirkpatrick P. (2004) "Oxaliplatin" Nature Reviews Drug Discovery 3(1): 11-2).

Криві доза-відповідь у гемцитабіну й оксаліплатину свідчать про різну чутливість досліджуваних ракових ліній клітин підшлункової залози (Фіг. 28 і Фіг. 29).

Таблиця 21

Значення  $IC_{50}$  гемцитабіну й оксаліплатину для ракових ліній клітин підшлункової залози

Лінія клітин	$IC_{50}$ при інгібуванні проліферації	
	гемцитабін	оксаліплатин
BxPC3-LVT	~2 нг/мл	500-1000 нг/мл
Capan1-LVT	~1 нг/мл	~100 нг/мл
DANG	~1 нг/мл	~500 нг/мл
Patu8988S-luci#6	>100 нг/мл	>500 нг/мл
MiaPaCa-2-LVT	50 нг/мл	50-100 нг/мл

Для інгібування проліферації клітин Patu8988S необхідні високі концентрації гемцитабіну ( $IC_{50} >100$  нг/мл) або оксаліплатину ( $IC_{50} >500$  нг/мл). Клітини DANG і BxPC3-LVT дуже чутливі до гемцитабіну, але не до оксаліплатину. Клітини MiaPaCa-2-LVT найбільш чутливі до оксаліплатину, але менше чутливі до обробки гемцитабіном (Фіг. 28, Фіг. 29 і таблиця 21).

Вплив хіміотерапевтичних засобів на експресію CLDN18.2 у клітинних лініях карциноми підшлункової залози

Спосіб дії, що запускається зв'язуванням IMAB362, строго залежить від наявності й щільності на поверхні клітин його мішені - CLDN18.2. Попередня обробка клітин DANG і Patu8988S гемцитабіном (GEM), а також гемцитабіном у комбінації з оксаліплатином (GemOx), приводила до підвищення рівнів мРНК і білка CLDN18.2 по даним аналізу методом ЗТ-ПЛР (Фіг. 30) і вестерн-блотинга (Фіг. 31) клітин без обробки й клітин з попередньою хіміотерапією. Отже, кількість білка CLDN18.2, доступного для IMAB362 на поверхні попередньо оброблених Gem або GemOx клітин ракових ліній підшлункової залози, зростало, як показала проточна цитометрія (Фіг. 32).

Обробка DANG і Patu8988S гемцитабіном приводить до підвищення рівня CLDN18.2. Patu8988S проявляє сильну підвищуювальну регуляцію CLDN18.2 при впливі Gem і меншу при впливі GemOx.

Вплив хіміотерапевтичних препаратів на клітинний цикл і експресію CLDN18.2

Проходження клітинного циклу відноситься до послідовності подій від одного мітотичного розподілу до іншого в клітині. За фазою спокою (G0/G1) випливає фаза синтезу ДНК (S), а потім фаза росту клітин (G2) і реплікації ДНК (M) з наступним розподілом клітини на дві дочірні клітини. Усяке втручання в клітинну машину може перешкоджати проходженню всього циклу в будь-якій фазі клітинного циклу. Наприклад, певні хіміотерапевтичні засоби можуть блокувати його у фазі G2 або M або одночасно в G2 і M (G2/M).

Обробка гемцитабіном клітин DANG або Patu8988S приводить до зупинки клітинного циклу у фазі S (Фіг. 33, Фіг. 34). Проводили аналіз Patu8988S при культивуванні з Gem. Обробка гемцитабіном не тільки приводить до зупинки клітинного циклу, але також змінює експресію CLDN18.2 (Фіг. 34B). Зміна щільності CLDN18.2 після обробки гемцитабіном було ще вище, якщо порівнювати проліферуючі клітини у фазі S і спочиваючі клітини у фазі G0/G1 (Фіг. 34C). У клітинах Patu8988S CLDN18.2 експресується на всіх фазах клітинного циклу. Після обробки гемцитабіном його експресія ще підвищується, а найвищі рівні CLDN18.2 у клітинах відзначаються в популяції клітин фази S.

Таке викривлення фенотипу пухлинних клітин значно впливає на біологічну ефективність терапевтичних антитіл. ADCC і CDC залежать від дози, тому зростання рівня мішені - CLDN18.2 забезпечує синергійну користь при стандартних режимах хіміотерапії.

Клітини KATO-III, лінії ракових клітин шлунка людини, культивували в середовищі RPMI 1640 (Invitrogen), що містить 20 % FCS (Perbio) і 2 mM Glutamax (Invitrogen) при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>, з додаванням або без цитостатичних сполук. 5-FU (Neofluor фірми Neoscor AG) тестували в концентрації 10 або 100 нг/мл, а оксаліплатин (Hospira) тестували в концентрації 50 або 500 нг/мл. Культивували 8×10<sup>5</sup> клітин KATO-III протягом 96 годин без заміни середовища або 72 годин з наступним культивуванням ще 24 години на стандартному середовищі, щоб зняти зупинку клітинного циклу, в 6-комірковому планшеті для культивування тканин при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Клітини збирали за допомогою трипсину/EDTA, промивали й аналізували.

Для позаклітинного виявлення CLDN18.2 проводили фарбування клітин за допомогою моноклонального антитіла IMAB362 проти CLDN18.2 (Ganymed) або контрольного антитіла того ж ізотипа (Ganymed). Як вторинний реагент використовували козяче антитіло проти hulgG-APC фірми Dianova.

Стадії клітинного циклу визначали вимірюючи вміст ДНК у клітинах. Це дозволяє розрізнити клітини у фазі G1, S або G2 клітинного циклу. У фазі S відбувається подвоєння ДНК, тоді як у фазі G2 клітини ростуть і готуються до мітозу. Аналіз клітинного циклу проводили за допомогою набору Cycletest Plus DNA Reagent Kit фірми BD Biosciences за методикою виробника. Одержання й аналіз даних проточної цитометрії проводили на установці BD FACS Cantoii (BD Biosciences) за допомогою програми Flowjo (Tree Star).

На Фіг. 35a й b стовпчики показують відсоток клітин у фазі G1, S або G2 клітинного циклу, відповідно. При культивуванні клітин KATO-III у середовищі відбувається зупинка клітинного циклу, бажано у фазі G1. При обробці клітин 5-FU вони блокуються бажано у фазі S. При обробці клітин KATO-III оксаліплатином відбувається збагачення клітинами бажано у фазах G1 і G2. Як видно з Фіг. 35c, зупинка клітинного циклу у фазі S або фазі G2 призводить до стабілізації або підвищення рівня CLDN18.2. Як тільки клітини виходять із якої-небудь фази клітинного циклу (Фіг. 35b), експресія CLDN18.2 на поверхні клітин KATO-III підсилюється (Фіг. 35d).

Клітини KATO-III піддавали попередній обробці іринотеканом або доцетакселем протягом 4 днів і проводили аналіз на експресію CLDN18.2 і зупинку клітинного циклу. Обробка клітин іринотеканом приводила до дозозалежного інгібування росту клітин і зупинки клітинного циклу у фазі S/G2 (Фіг. 36). Обробка клітин доцетакселем приводила до дозозалежного інгібування росту клітин і зупинці клітинного циклу у фазі G2 (Фіг. 36).

Вплив хіміотерапії на індуковану IMAB362 антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) Проводили ряд експериментів конститутивно які експресують CLDN18.2 клітинами ракових ліній підшлункової залози Patu8988S і DANG для дослідження ефектів гемцитабіну (Gem) або гемцитабіну + оксаліплатину (GemOx) на IMAB 362-опосередковану ADCC. Порівнювали криві доза-відповідь для опосередкованого IMAB362 лізису клітин при попередній обробці клітин і при культивуванні в середовищі.

Криві доза-відповідь у попередньо оброблених Gem (1 нг/мл) або GemOx (Gem 1 нг/мл + Ox 10 нг/мл) клітин DANG (2 дня) зміщалися нагору й уліво в порівнянні з необробленими клітинами мішені (Фіг. 37A). Обробка ракових клітин Gem або GemOx приводила до підвищення рівня CLDN18.2 і більшої схильності IMAB 362-опосередкованої ADCC. Після обробки хіміотерапевтичними засобами в клітин DANG спостерігалось зниження значень EC<sub>50</sub> і

підвищення максимального лізису клітин при IMAB 362-опосередкованої ADCC (Фіг. 37B).

Очищали мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMС), включаючи NK-клітини, моноцити, мононуклеари або інші ефекторні клітини від здорових донорів, центрифугуванням у градієнті щільності Ficoll Нураque. Промиті ефекторні клітини висівали в середовище X-Vivo. При цьому як клітини мішені використовували клітини KATO-III, які ендогенно експресують CLDN18.2, і які походять зі шлунка. Клітини мішені стабільно експресували люциферазу, а Lucifer жовтий окисниться тільки життєздатними клітинами. Додавали очищене антитіло IMAB362 проти CLDN18.2 у різних концентраціях, а як антитіло для ізотипового контролю використовували стороннє химерне антитіло проти hulgG1. Зразки аналізували на цитоліз вимірюючи люмінесценцію в результаті окиснення Lucifer жовтого, яка є заходом кількості життєздатних клітин, що залишилися після індукованої IMAB362 цитотоксичності. KATO-III, попередньо оброблені протягом 3 днів іринотеканом (1000 нг/мл), доцетакселем (5 нг/мл) або цисплатином (2000 нг/мл), порівнювали з необробленими клітинами мішені, що культивувалися в середовищі, і проводили кількісне визначення IMAB 362-індукованої ADCC.

При попередній обробці протягом 3 днів іринотеканом, доцетакселем або цисплатином клітини KATO-III проявляли зниження рівня життєздатних клітин у порівнянні із клітинами мішені, що культивувалися в середовищі (Фіг. 38a), а експресія клаудину 18.2 у клітинах при попередній обробці іринотеканом, доцетакселем або цисплатином підвищувалася в порівнянні із клітинами, що культивувалися в середовищі (Фіг. 38b).

Крім того, попередня обробка клітин KATO-III іринотеканом, доцетакселем або цисплатином підсилювала здатність IMAB362 індукувати ADCC (Фіг. 38c, d).

Вплив хіміотерапії на IMAB 362-індуковану CDC

Дія IMAB362 на CDC досліджували шляхом інкубації із клітинами мішені в присутності сироватки людини як джерела комплементу,

клітини, що культивувалися в середовищі, MiaPaCa-2-LVT проявляли значення  $EC_{50}$  для IMAB 362-специфічного лізису в 7665 нг/мл. Обробка Gem приводила до зниження  $EC_{50}$  до 4677 нг/мл поряд з підвищенням максимального ступеня лізису (Фіг. 39).

Дія хіміотерапевтичних засобів на IMAB 362-індуковану CDC аналізували при попередній обробці ракових клітин шлунка KATO-III з 10 нг/мл 5-FU і 500 нг/мл оксаліплатину (5-FU+OX) протягом 48 годин. Репрезентативні криві доза-відповідь за IMAB 362-індукованою CDC при попередній хіміотерапевтичній обробці клітин KATO-III представлені на Фіг. 40. Попередня обробка ракових клітин протягом 48 годин підсилювала здатність IMAB362 індукувати ADCC, що приводило до підвищення максимального ступеня лізису в попередньо оброблених ракових клітин у порівнянні з необробленими клітинами.

Приклад 8. Ефективність IMAB362 у комбінації з хіміотерапією на моделях пухлин у мишей

Досліджували протипухлинну активність IMAB362 у комбінації з Gem або GemOx на підшкірних моделях ксенотрансплантації карциноми підшлункової залози, які раніше використовувалися для тестування ефективності IMAB362 як єдиного засобу.

В оброблених IMAB362 мишей nude с пухлинами BxPC3-LVT або MiaPaCa-2-LVT проявлялося значне вповільнення росту пухлин у порівнянні з контрольними мишами, які одержували контрольний сольовий розчин. Хіміотерапія гемцитабіном аж до 100 мг/кг без додаткової обробки IMAB362 не виявляла істотного терапевтичного впливу на ксенотрансплантати BxPC3-LVT або MiaPaCa-2-LVT. Напроти, комбінована обробка 50-100 мг/кг гемцитабіну плюс IMAB362 приводила до значного посилення інгібування росту пухлин і продовженню строку життя в мишей з пухлинами в порівнянні з мишами, які одержували тільки хіміотерапію (Фіг. 41, Фіг. 42, Фіг. 43). Ці спостереження вказують на існування синергійних терапевтичних ефектів при комбінуванні гемцитабіну й імунотерапії IMAB362.

При використанні високих доз гемцитабіну  $2 \times 150$  мг/кг у тиждень у привитих ксенотрансплантатів пухлин MiaPaCa-2-LVT сильно інгібувався ріст пухлин незалежно від обробки IMAB362 (Фіг. 44A). Однак миші, що одержували комбіновану терапію IMAB362 і гемцитабіном, проявляли значно більш тривалий тривалість життя в порівнянні з мишами, які одержували гемцитабін як єдиний засіб (Фіг. 44B).

Приклад 9. Обробка ZA/IL-2 приводить до експансії великої кількості Т-клітин V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

PBMСs культивували протягом 14 днів у середовищі RPMI з додаванням 300 Од./мл IL-2 і 1 мкм золедронові кислоти (ZA) або без неї. У день 0 і день 14 визначали відсоток Т-клітин V $\gamma$ 9+V $\delta$ 2+ у популяції лімфоцитів CD3+ і відсоток клітин CD16+ у популяції Т-клітин CD3+V $\gamma$ 9+V $\delta$ 2+ багатобарвним методом FACS.

Для виживання й росту лімфоцитів потрібне додавання IL-2 у культури PBMСs. Вони ефективно експандують у культурах при додаванні 300 Од./мл IL-2. Методом FACS з використанням специфічних до V $\gamma$ 9 і V $\delta$ 2 антитіл показали, що додавання ZA/IL-2 специфічно

індукує нагромадження Т-клітин V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Через 14 днів популяція лімфоцитів CD3+ може містити до 80 % Т-клітин V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Частина Т-клітин V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 експресує CD16, причому збагачення цими клітинами в популяції лімфоцитів CD3+ становить 10-700 разів, залежно від донора. Збагачення Т-клітинами CD16+V $\gamma$ 9+V $\delta$ 2+ у культурах становить 10-600 раз у порівнянні з культурами, які ростуть без ЗА. Робимо висновок, що обробка PBMCs in vitro за допомогою ЗА/IL-2 приводить до підвищувальної регуляції Fc $\gamma$ III-рецептора CD16, який опосередковує ADCC у значної частини Т-клітин у $\delta$ .

Подібно до NK-клітин, при викликаній ЗА/IL-2 експансії Т-клітини V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 будуть позитивними за CD16 - рецептором Fc $\gamma$ III, через який пов'язане із клітинами антитіло запускає ADCC. Щоб визначити, будуть чи Т-клітини V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 здатні індукувати сильну ADCC у комбінації з IMAB362, проводили ряд експериментів.

PBMCs, отримані від 2 різних донорів (#1 і #2), культивували в середовищі з 300 Од./мл IL-2 і 1 мкМ ЗА або без неї. Через 14 днів клітини збирали й додавали при зростаючих їх концентраціях (0,26 нг/мл - 200 мкг/мл) IMAB362 до клітин NUGC-4, які експресують CLDN18.2. Визначали специфічну загибель клітин люциферазним методом. Проводили аналіз ADCC з 27 донорами при культивуванні в присутності 300 Од./мл IL-2 з ЗА або без неї, при цьому клітини NUGC-4 служили як мішені. Для кожного донора обчислювали значення EC<sub>50</sub> із кривих доза-відповідь і оцінювали максимальний ступінь специфічної загибелі при дозі в 200 мкг/мл IMAB362 на точкових графіках.

При використанні PBMCs, що культивувалися 14 днів з ЗА/IL-2, спостерігалася сильна IMAB 362-залежна активність ADCC проти CLDN18.2-позитивних клітин NUGC-4. При використанні оброблених ЗА/IL-2 культур PBMCs активність ADCC залежить від присутності Т-клітин V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. При культивуванні клітин без ЗА активність ADCC знижується в більшості донорів. У цих культурах залишкова активність ADCC залежить від NK-клітин. При тестуванні більш 20 донорів аналіз ADCC показує, що обробка PBMCs за допомогою ЗА/IL-2 поліпшує значення EC<sub>50</sub> і максимальному ступеня специфічної загибелі в порівнянні з культивуванням PBMCs тільки з одним IL-2.

Приклад 10. Ефективність IMAB362 у комбінації з гемцитабіном на моделі метастазів у мишей

Для аналізу впливу обробки IMAB362 у комбінації з гемцитабіном на метастази Patu8988S у легенів in vivo, по 12 безтімусних мишей nude Hsd: Foxn1<sup>nu</sup> на групу одержували внутрішньовенну ін'єкцію 2 $\times$ 10<sup>6</sup> клітин Patu8988S у хвостову вену. Через 14 днів після введення пухлинних клітин миші одержували 200 мкг IMAB362 або PBS як контролю (в/в-в/о) по 2 рази на тиждень плюс раз на тиждень дозу в 100 мг/кг гемцитабіну в/о протягом 4 тижнів. Обробку IMAB362 або PBS продовжували до забивання мишей на 70-й день після введення пухлинних клітин. Проводили аналіз навантаження легенів ксенотрансплантованими пухлинами методом кількісної ПЛР на ДНК людини в препаратах легенів і оптичним методом імуногістологічного фарбування за допомогою антитіла проти МНС-I людини (клон EPR1394Y). Результати показують, що в мишей, що одержували IMAB362 плюс гемцитабін, значно знижувалася кількість ДНК людини в легенів (Фіг. 45A), а площа поверхні, пофарбованої комплексом проти МНС-I людини на зрізах легенів, була значно менше, чим у легенях у мишей, що одержували стороннє антитіло плюс гемцитабін (Фіг. 45B). Обидва методи показали зниження навантаження ксенотрансплантатами пухлин Patu8988s у легенях у мишей, які одержували IMAB362 плюс гемцитабін, свідчаючи, що комбінування з IMAB362 значно перевершує монотерапію гемцитабіном.

Реєстраційний номер заявника або довіреної  
особи 342-73 РСТ

Міжнародна заява №

ВІДОМОСТІ ПРО ДЕПОНОВАНІ МІКРООРГАНІЗМИ АБО ІНШИЙ БІОЛОГІЧНИЙ МАТЕРІАЛ  
(Договір про патентну кооперацію (РСТ), правило 13bis)

А. Відомості, надані нижче, відносяться до депонованих мікроорганізмів або іншого біологічного матеріалу, згаданого в описі на сторінці 49, рядок 3

В. Ідентифікація депонованого матеріалу  
на

Інші депоновані матеріали вказані  
додатковому аркуші ☒

Назва органу по депонуванню  
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Адреса органу по депонуванню (включаючи поштовий індекс і назву країни) Машеродер BeГ 16 38124 Брауншвейг Німеччина	
Дата реєстрації депонованого матеріалу 19 жовтня 2005	Реєстраційний номер DSM ACC2737
С. ДОДАТКОВІ ВІДОМОСТІ (залишити порожнім, якщо не застосовується)	Продовження на додатковому аркуші <input type="checkbox"/>
- Мишача (Mus Musculus) міелома Р3 × 63Ag8U.1 схрещена з мишачими (Mus Musculus) спленоцитами - Гібридома, що продукує антитіла до людського білка клаудин-18A2	
D. КРАЇНИ, ДЛЯ ЯКИХ НАДАНО ВІДОМОСТІ (якщо відомості не для всіх зазначених держав)	
E. ДОДАТКОВІ ВІДОМОСТІ (залишити порожнім, якщо не застосовується)	
Відомості, надані нижче, будуть представлені в Міжнародне бюро пізніше (вказати загальну кількість відомостей, наприклад, "Реєстраційний Номер Депонованого Матеріалу")	

Тільки для використання приймаючою установою	Тільки для використання Міжнародним бюро
<input type="checkbox"/> Цей аркуш був одержаний із міжнародною заявою:	<input type="checkbox"/> Цей аркуш був одержаний Міжнародним Бюро (дата):
Уповноваженим співробітником	Уповноваженим співробітником

Форма PCT /RO/134 (липень 1998 року; передруковано в січні 2004 року)

5 Нова Міжнародна Заява на Патент  
"Ганімед Фармасьютікалс АГ" (Ganymed Pharmaceuticals AG) та ін.  
"ТЕРАПІЯ З ВИКОРИСТАННЯМ АНТИТІЛ ДО ЛЮДСЬКОГО БІЛКА КЛАУДИН 18,2 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ"  
Наш вих. №: 342-73 PCT (Договір про патентну кооперацію)

10 Додатковий Лист Для Біологічного Матеріалу  
Відомості про наступні депоновані матеріали:  
1) Назва та адреса установи по депонуванню для депонованих матеріалів (DSM ACC2738, DSM ACC2739,  
15 DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747,  
DSM ACC2748):  
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
Машеродер BeГ 16  
38124 Брауншвейг  
DE  
20 2) Назва та адреса установи по депонуванню для депонованих матеріалів (DSM ACC2808, DSM ACC2809,  
DSM ACC2810):  
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
Інхоффенштр. 7 Б  
25 38124 Брауншвейг  
DE

Дата реєстрації депонованого матеріалу	Реєстраційний номер	Відомості, надані нижче, відносяться до депонованого мікроорганізму в описі на наступній сторінці(ках)
19 жовтня 2005	DSM ACC2738	сторінка 49, рядок 4
19 жовтня 2005	DSM ACC2739	сторінка 49, рядок 5
19 жовтня 2005	DSM ACC2740	сторінка 49, рядок 6
19 жовтня 2005	DSM ACC2741	сторінка 49, рядок 7
19 жовтня 2005	DSM ACC2742	сторінка 49, рядок 8
19 жовтня 2005	DSM ACC2743	сторінка 49, рядок 9
17 листопада 2005	DSM ACC2745	сторінка 49, рядок 10
17 листопада 2005	DSM ACC2746	сторінка 49, рядок 11
17 листопада 2005	DSM ACC2747	сторінка 49, рядок 12
17 листопада 2005	DSM ACC2748	сторінка 49, рядок 13
26 жовтня 2006	DSM ACC2808	сторінка 49, рядок 14
26 жовтня 2006	DSM ACC2809	сторінка 49, рядок 15
26 жовтня 2006	DSM ACC2810	сторінка 49, рядок 16

Додаткові відомості для всіх згаданих вище депонованих матеріалів:

- Мишача (Mus Musculus) міелома P3 × 63Ag8U.1 схрещена з мишачими (Mus Musculus) спленоцитами
  - Гібридома, що продукує антитіла до людського білка клаудин-18A2
- Депозитор:
- Всі згадані вище депозитарії були зроблені:
- Ганімед Фармасьютікалс АГ" (Ganymed Pharmaceuticals AG)
- Фрайліґратштр. 12
- 55131 Майнц
- DE

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ

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

<130> 342-73 PCT

<150> PCT/EP2013/000505

<151> 2013-02-20

<160> 54

<170> патентована версія 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val  
260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val  
260

<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> Homo sapiens (людина)  
<400> 3  
Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn  
1 5 10

<210> 4  
<211> 11  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> Homo sapiens (людина)  
<400> 4  
Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln  
1 5 10

<210> 5  
<211> 14  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> Homo sapiens (людина)  
<400> 5  
Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe  
1 5 10

<210> 6  
<211> 13  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> Homo sapiens (людина)  
<400> 6  
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly  
1 5 10

<210> 7  
<211> 13  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> Homo sapiens (людина)

<400> 7

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

<210> 8

<211> 55

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 8

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala  
50 55

<210> 9

<211> 24

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 9

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

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly  
20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 10

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

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe  
20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
35 40

<210> 11

<211> 153

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
145 150

<210> 12

<211> 107

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13  
 <211> 326  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту  
 <400> 13  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 20 25 30  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 35 40 45  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 50 55 60  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
 65 70 75 80  
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
 85 90 95  
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 100 105 110  
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 180 185 190  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325  
 <210> 14  
 <211> 466  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
 <400> 14  
 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 115 120 125  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 130 135 140  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 165 170 175  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 180 185 190  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 195 200 205  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 210 215 220  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 225 230 235 240  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 245 250 255  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 260 265 270  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 275 280 285  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 290 295 300  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 305 310 315 320  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 325 330 335  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 340 345 350  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 355 360 365  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 370 375 380  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 385 390 395 400  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 405 410 415  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 420 425 430  
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 435 440 445

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

Gly Lys  
465

<210> 15

<211> 467

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 15

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

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

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

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

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala  
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr  
100 105 110

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
130 135 140

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 225 230 235 240  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460  
 Pro Gly Lys  
 465

<210> 16

<211> 465

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>



<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
130 135 140

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

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
165 170 175

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
180 185 190

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
210 215 220

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
225 230 235 240

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

275                                      280                                      285  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 290                                      295                                      300  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 325                                      330                                      335  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 340                                      345                                      350  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 355                                      360                                      365  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 370                                      375                                      380  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 405                                      410                                      415  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 420                                      425                                      430  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 435                                      440                                      445  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 450                                      455                                      460  
 Lys  
 465

<210> 17  
 <211> 467  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
 <400> 17

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg  
 20                                      25                                      30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35                                      40                                      45

Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
50						55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Ser	Trp	Arg	Gly	Asn	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
		115					120					125			
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
						135						140			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
145					150					155					160
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165					170					175	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180					185					190		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
						215					220				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
225					230					235					240
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245					250					255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265						270	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		275					280					285			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
					295						300				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
305					310					315					320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				325					330					335	

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
465

<210> 18

<211> 466

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 115 120 125  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 130 135 140  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 165 170 175  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 180 185 190  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 195 200 205  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 210 215 220  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 225 230 235 240  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 245 250 255  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 260 265 270  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 275 280 285  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 290 295 300  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 305 310 315 320  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 325 330 335  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 340 345 350  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 355 360 365  
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 370 375 380  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 385 390 395 400

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

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

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

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

Gly Lys  
465

<210> 19

<211> 469

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	165		170		175	
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe						
	180		185		190	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val						
	195		200		205	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val						
	210		215		220	
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys						
225		230		235		240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu						
	245		250		255	
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr						
	260		265		270	
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val						
	275		280		285	
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val						
	290		295		300	
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser						
305		310		315		320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu						
	325		330		335	
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala						
	340		345		350	
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro						
	355		360		365	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln						
	370		375		380	
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala						
385		390		395		400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr						
	405		410		415	
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu						
	420		425		430	
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser						
	435		440		445	
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser						

450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys  
465

<210> 20  
<211> 240  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

<210> 21  
 <211> 235  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
 <400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22  
 <211> 234  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
 <400> 22  
 Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser  
 20 25 30  
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn  
 35 40 45  
 Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 50 55 60  
 Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp  
 100 105 110  
 Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230  
 <210> 23

<211> 240  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла  
 <400> 23  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
 20 25 30  
 Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125  
 Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240  
 <210> 24  
 <211> 240  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25

<211> 239

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 240

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 240

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28

<211> 234

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: химерні моноклональні антитіла

<400> 28

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

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

	20		25		30
Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn					
	35		40		45
Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro					
	50		55		60
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp					
	65		70		75
					80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
		85		90	95
Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr					
	100		105		110
Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg					
	115		120		125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln					
	130		135		140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr					
	145		150		155
					160
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser					
		165		170	175
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	180		185		190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	195		200		205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					
	210		215		220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	225		230		

<210> 29

<211> 117

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 29

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

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



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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 34

<211> 120

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 34

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe  
20 25 30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys  
50 55 60

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr  
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 35  
<211> 113  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту  
<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

Lys

```

<210> 36
<211> 106
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)
<213> штучна послідовність
<220>
<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту
<400> 36
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1             5             10             15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
          20             25             30

```

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 113

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 39  
<211> 113  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту  
<400> 39  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 40  
<211> 112

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 113

<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 42  
 <211> 113  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту  
 <400> 42  
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110

Lys

<210> 43  
 <211> 107  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності:трансляція ПЛР продукту  
 <400> 43  
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr  
 20 25 30  
 Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala



65		70		75		80									
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	

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

<210> 44  
 <211> 15  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Епітоп  
 <400> 44

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

<210> 45  
 <211> 15  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Епітоп  
 <400> 45

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

<210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Епітоп  
 <400> 46

Leu	Tyr	Asn	Asn	Pro	Val	Thr	Ala	Val	Phe	Asn	Tyr	Gln	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Епітоп  
 <400> 47

Pro	Val	Thr	Ala	Val	Phe	Asn	Tyr	Gln	Gly	Leu	Trp	Arg	Ser	Cys
1				5					10					15

<210> 48  
 <211> 15  
 <212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Епітоп

<400> 48  
Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser  
1 5 10 15

<210> 49  
<211> 15  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> Епітоп  
<400> 49

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr  
1 5 10 15

<210> 50  
<211> 15  
<212> PRT (група захисної/радикал транслокації)  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> Епітоп  
<400> 50

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly  
1 5 10 15

<210> 51  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> олігонуклеотид  
<400> 51

agagagctct ggcttcaccg agtg

24

<210> 52  
<211> 26  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> олігонуклеотид  
<400> 52

ccagaagtta gtcaccagca tggtgg

26

<210> 53  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність  
<220>  
<223> олігонуклеотид  
<400> 53

gggataattt cagctgacta aacag

25

<210> 54  
<211> 25  
<212> ДНК

<213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Олігонуклеотид  
 <400> 54  
 ttccggttag ttaggtgcag ttatc

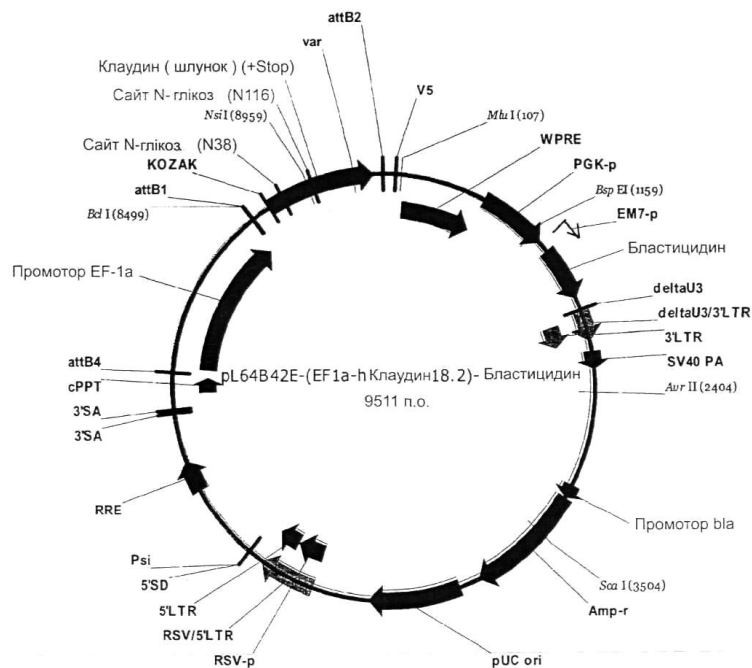
25

5

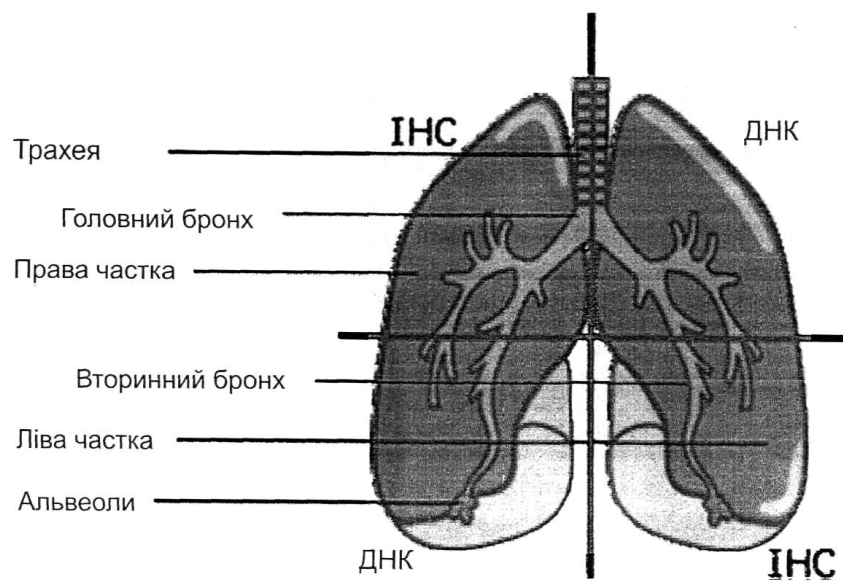
## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування антитіла, яке зв'язується з CLDN18.2 для лікування раку підшлункової залози, яке характеризується тим, що ракові клітини підшлункової залози експресують CLDN18.2, де вказане застосування передбачає введення пацієнтові (i) антитіла, і (ii) засобу, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, де
- 10 (a) антитіло зв'язується з CLDN18.2 і опосередковує знищення клітин, що експресують CLDN18.2, де антитіло містить важкий ланцюг антитіла, що містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 32, і легкий ланцюг антитіла, що містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 39, і
- 15 (b) засіб, вибраний з групи, що складається з гемцитабіну, його проліків або їх солей.
2. Застосування за п. 1, яке **відрізняється** тим, що експресія CLDN18.2 відбувається на клітинній поверхні ракових клітин.
3. Застосування за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що введення засобу, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, також включає додатковий засіб, який індукує зупинку клітинного
- 20 циклу або нагромадження клітин в одній або декількох фазах клітинного циклу, бажано в одній або декількох фазах клітинного циклу, відмінних від фази G1, краще у фазі G2 і/або фазі S.
4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що введення засобу, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, також включає додатковий засіб, вибраний із групи, яка складається з аналогів нуклеозидів, сполук платини, аналогів камптотецину, таксанів,
- 25 їх форм проліків, солей і комбінацій.
5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що введення засобу, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, також включає додатковий засіб, вибраний із групи, яка складається із 5-фторурацилу, оксаліплатину, іринотекану, паклітакселю, пов'язаного з альбуміном паклітакселю, їх форм проліків, солей і комбінацій.
- 30 6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що введення засобу, який стабілізує або посилює експресію CLDN18.2, також включає додатково засіб, який індукує імуногенну загибель клітин.
7. Застосування за п. 6, яке **відрізняється** тим, що засіб, який індукує імуногенну загибель клітин, включає оксаліплатин.
- 35 8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що застосування передбачає введення комбінації з гемцитабіну й оксаліплатину, комбінації з гемцитабіну й цисплатину, комбінації з гемцитабіну й карбоплатину або комбінації з оксаліплатину, 5-фторурацилу або його форм проліків і іринотекану.
9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, яке **відрізняється** тим, що застосування передбачає введення фолінової кислоти, оксаліплатину, 5-фторурацилу або його форм проліків і іринотекану.
- 40 10. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, яке **відрізняється** тим, що важкий ланцюг антитіла, представлений SEQ ID NO: 32, містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 17, і легкий ланцюг антитіла, представлений SEQ ID NO: 39, містить амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 24.
- 45 11. Застосування за будь-яким з пп. 1-11, яке **відрізняється** тим, що застосування додатково включає введення засобу, що стимулює Т-клітини уδ, причому Т-клітини уδ бажано представлені Т-клітинами Vγ9Vδ2, і вказаний засіб, який уδ стимулює Т-клітини уδ, переважно представлений бісфосфонатом і прийнятніше представлений азотовмісним бісфосфонатом (амінобісфосфонатом).
- 50 12. Застосування за п. 11, яке **відрізняється** тим, що засіб, який стимулює Т-клітини уδ, вибирається із групи, яка складається із золедронової кислоти, клодронової кислоти, ібандронової кислоти, памідронової кислоти, ризедронової кислоти, мінодронової кислоти, олпадронової кислоти, алендронової кислоти, інкадронової кислоти та їх солей.

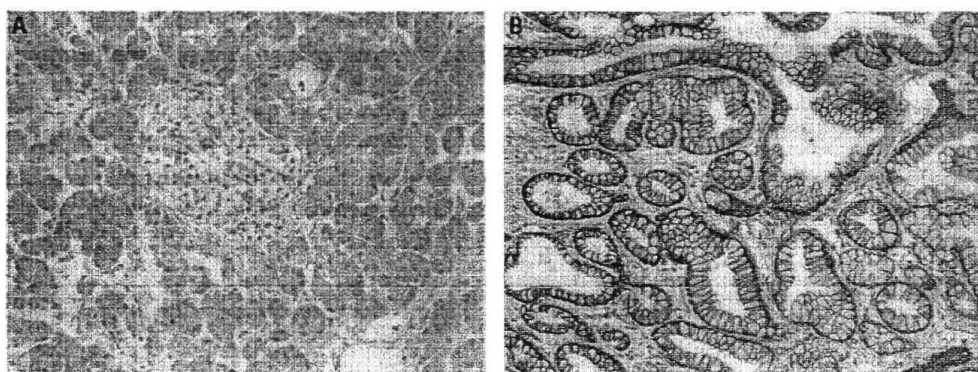
13. Застосування за будь-яким з пп. 11-12, яке **відрізняється** тим, що засіб, який стимулює Т-клітини  $\gamma\delta$ , уводиться в комбінації з інтерлейкіном-2.
14. Застосування за будь-яким з пп. 1-13, яке **відрізняється** тим, що антитіло опосередковує знищення клітин за одним або декількома із-поміж опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC) лізису, індукції апоптозу й інгібування проліферації.
15. Застосування за будь-яким з пп. 1-14, яке **відрізняється** тим, що антитіло вибране із групи, яка складається з (i) антитіла, виробленого й/або одержаного із клону, депонованого під номером доступу DSM ACC2810, (ii) антитіла, яке являє собою химеризовану або гуманізовану форму антитіла за п. (i), (iii) антитіла, яке має специфічність антитіла за п. (i), і (iv) антитіла, що містить антигензв'язувальну частину або антигензв'язувальний сайт, зокрема варіабельну область антитіла за п. (i) та антитіла, яке бажано має специфічність, за п. (i).
16. Застосування за будь-яким з пп. 1-15, яке **відрізняється** тим, що застосування передбачає введення антитіла у дозі аж до 1000 мг/м<sup>2</sup> або в дозі від 300 до 600 мг/м<sup>2</sup>.
17. Застосування за будь-яким з пп. 1-16, яке **відрізняється** тим, що рак підшлункової залози включає первинний рак, рак на пізніх стадіях або метастатичний рак або їх комбінації типу комбінації первинного раку й метастатичного раку підшлункової залози.
18. Застосування за п. 17, яке **відрізняється** тим, що метастатичний рак включає метастази в лімфатичних вузлах, яєчниках, печінці або легенів або їх комбінації.
19. Застосування за будь-яким з пп. 1-18, яке **відрізняється** тим, що рак підшлункової залози включає рак проток підшлункової залози.
20. Застосування за будь-яким з пп. 1-19, яке **відрізняється** тим, що рак підшлункової залози включає аденокарциному або карциному або їх комбінації.
21. Застосування за будь-яким з пп. 1-20, яке **відрізняється** тим, що рак підшлункової залози включає аденокарциному проток, слизувату аденокарциному, нейроендокринну карциному або ацинозно-клітинну карциному або їх комбінації.
22. Застосування за будь-яким з пп. 1-21, яке **відрізняється** тим, що рак підшлункової залози частково або повністю не піддається лікуванню гемцитабіном типу монотерапії гемцитабіном.
23. Застосування за будь-яким з пп. 1-22, яке **відрізняється** тим, що профілактика раку підшлункової залози включає запобігання рецидиву раку підшлункової залози.
24. Застосування за будь-яким з пп. 1-23, яке **відрізняється** тим, що пацієнт переніс операцію із приводу раку підшлункової залози.
25. Застосування за будь-яким з пп. 1-24, яке **відрізняється** тим, що пацієнт має передракові ураження підшлункової залози, зокрема передракові ураження підшлункової залози, що включають виникнення злоякісних гістологічних змін у протоках підшлункової залози.



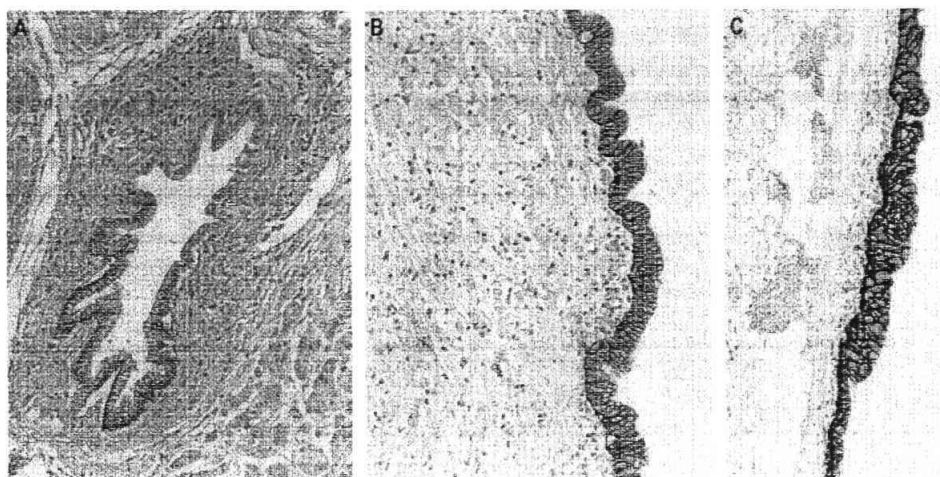
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

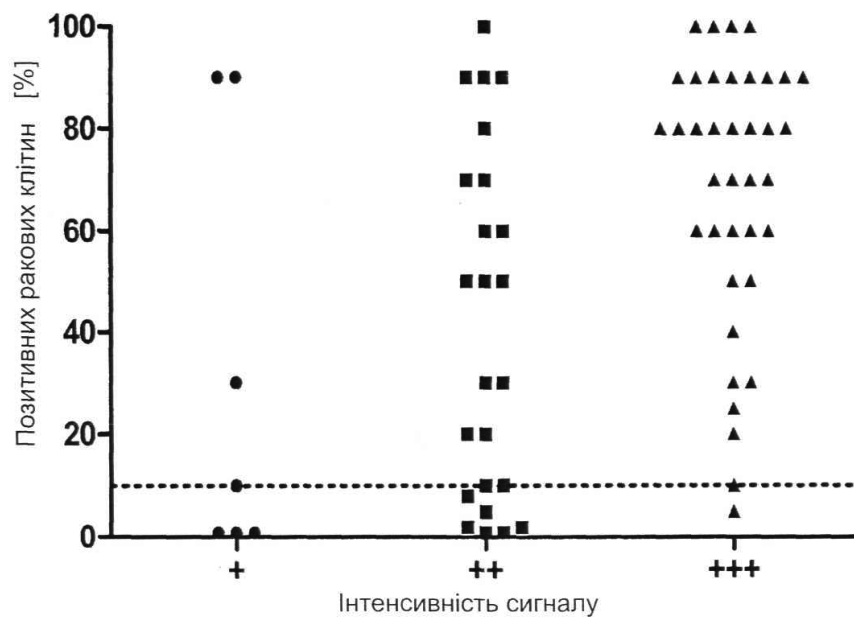


Fig. 5

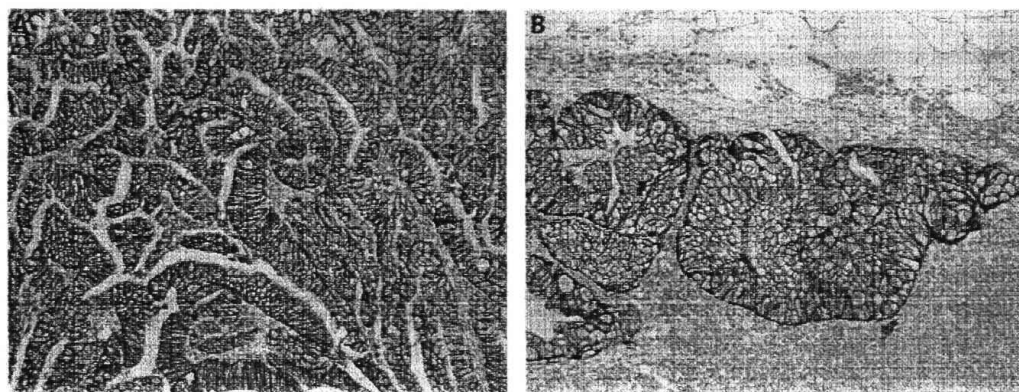


Fig. 6

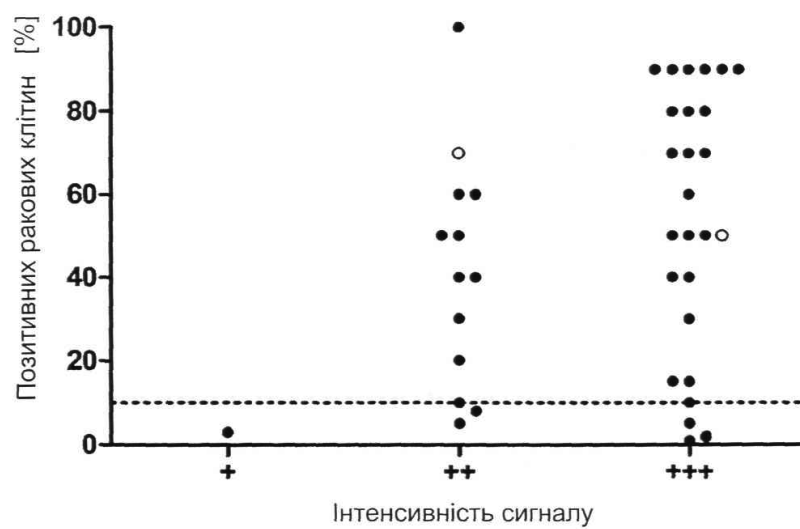
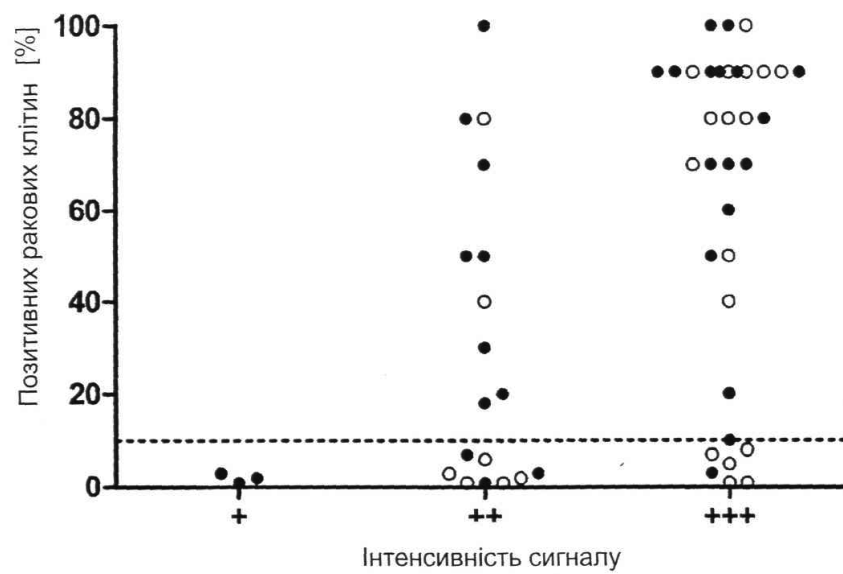
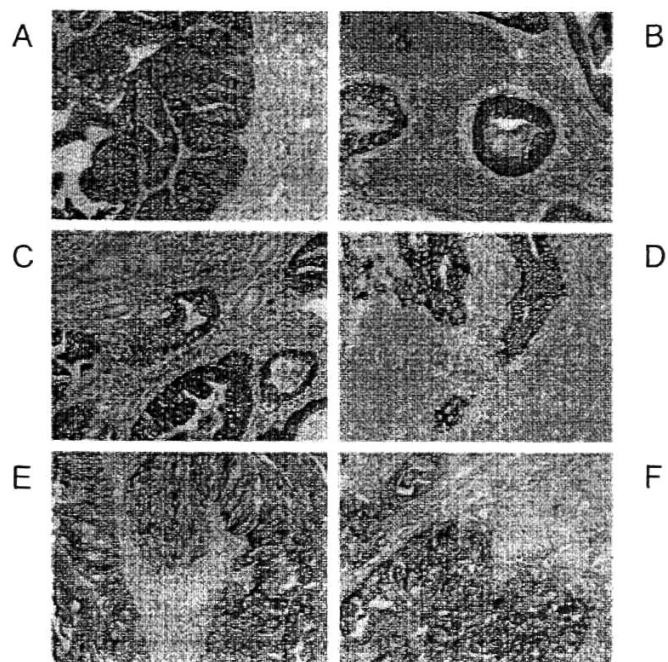


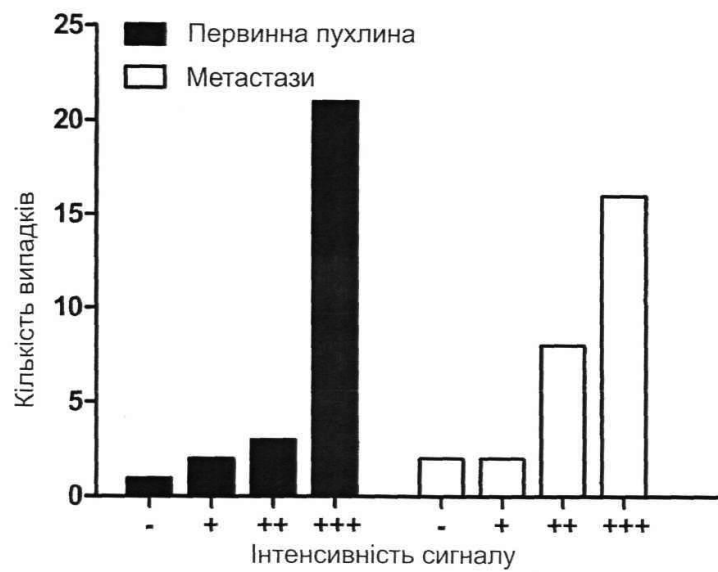
Fig. 7



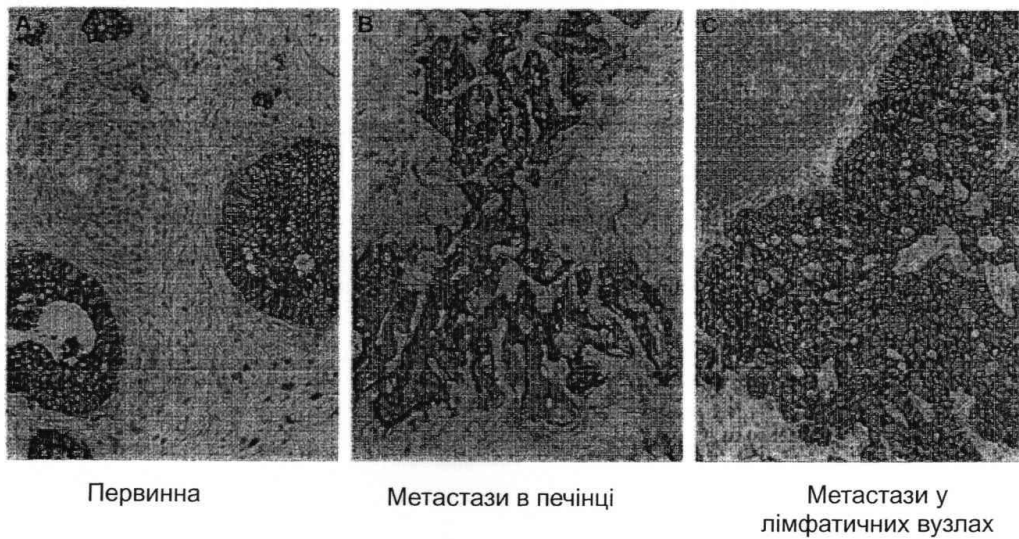
Фіг. 8



Фіг. 9

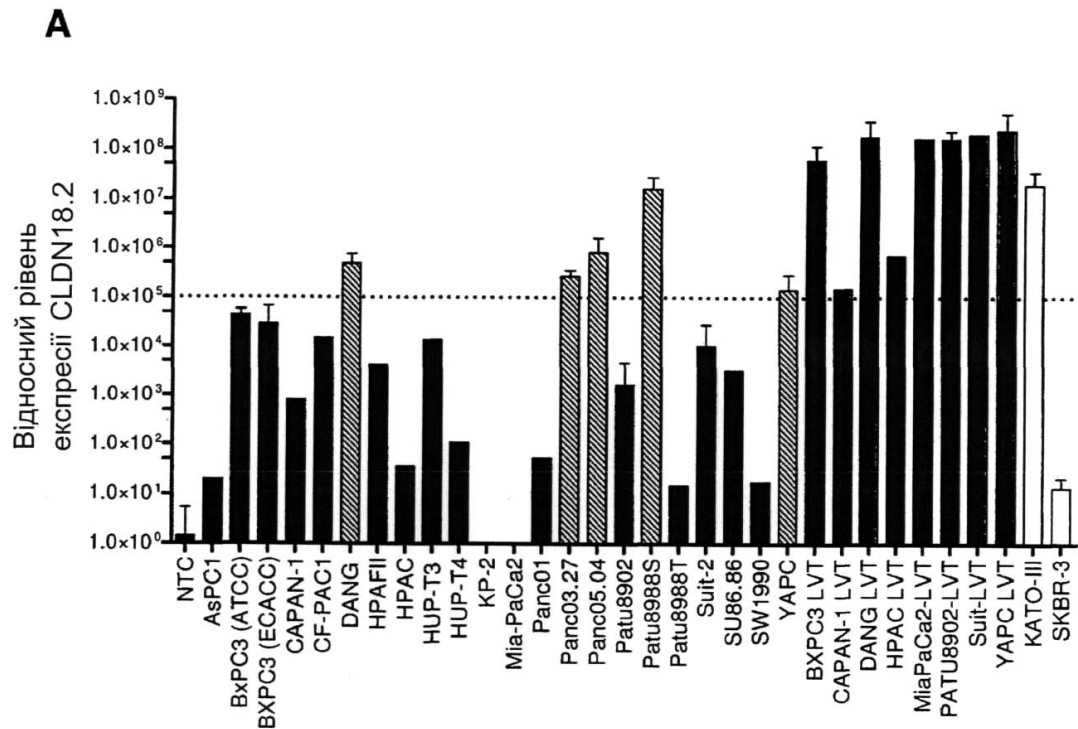


Фіг. 10

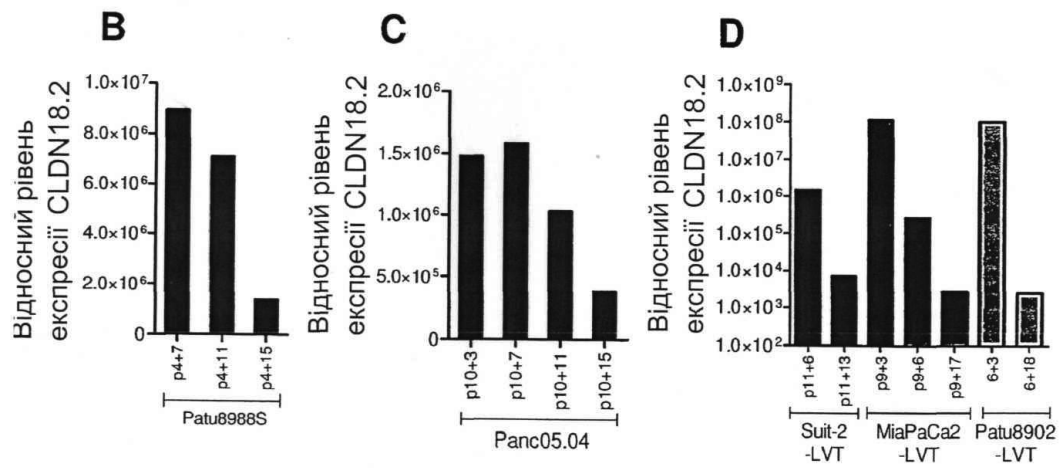


Фіг. 11

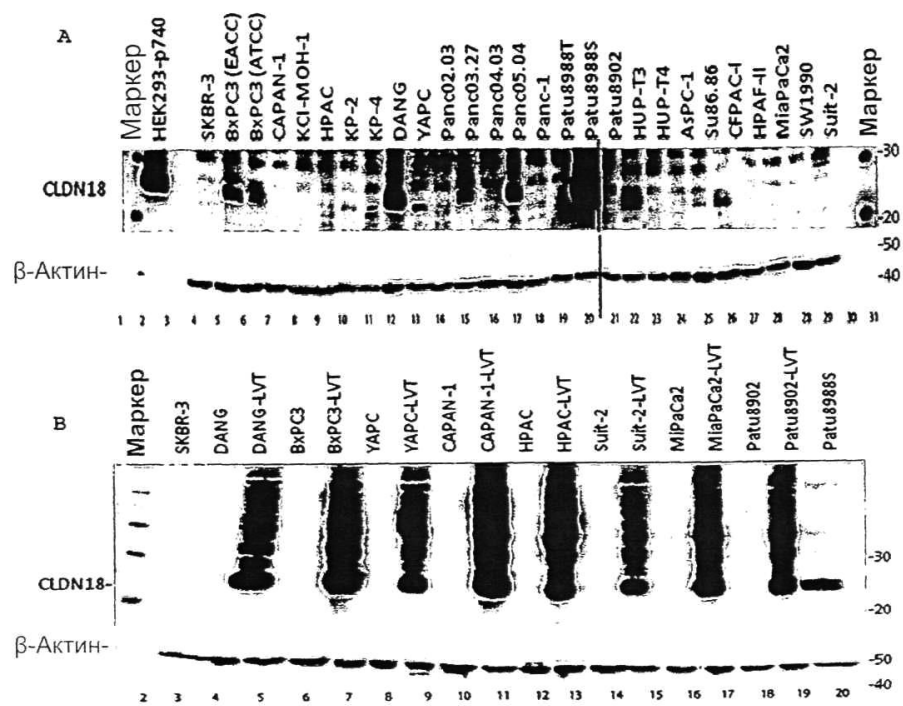




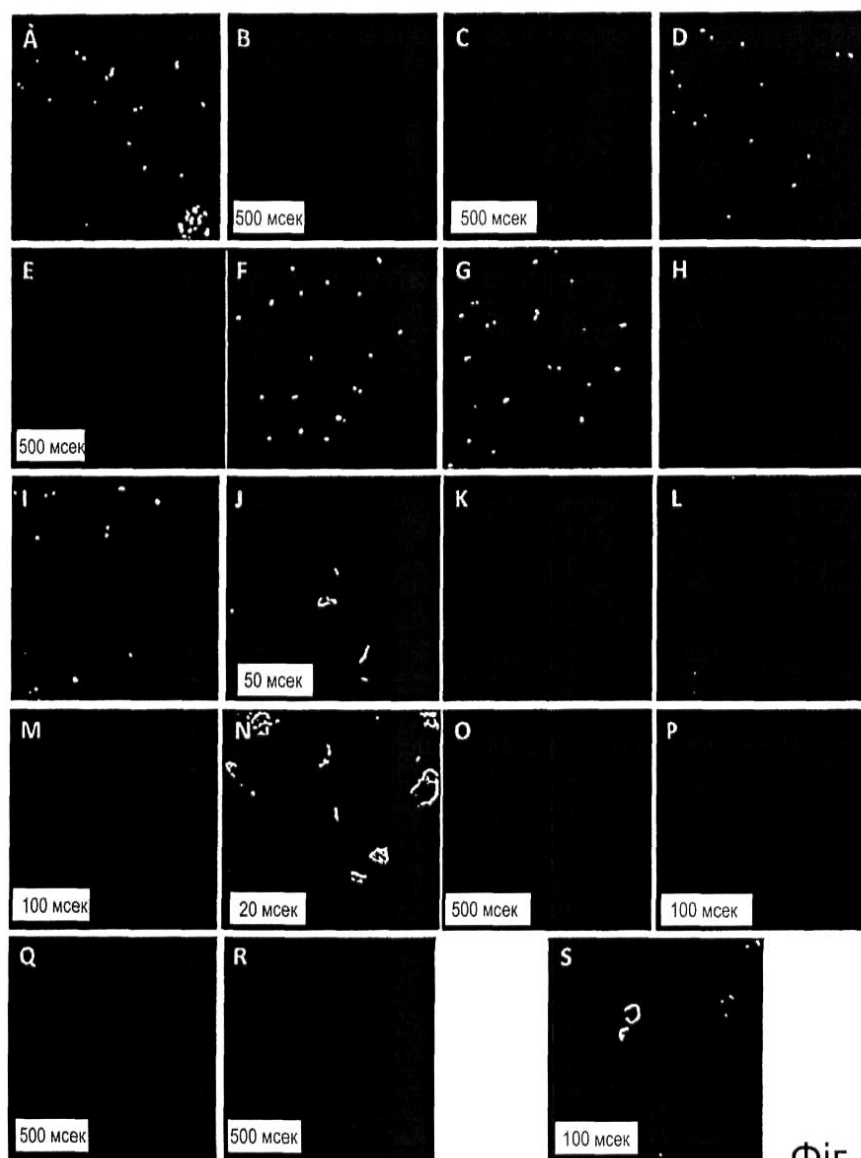
Фіг. 12



Фіг. 12 (продовження)

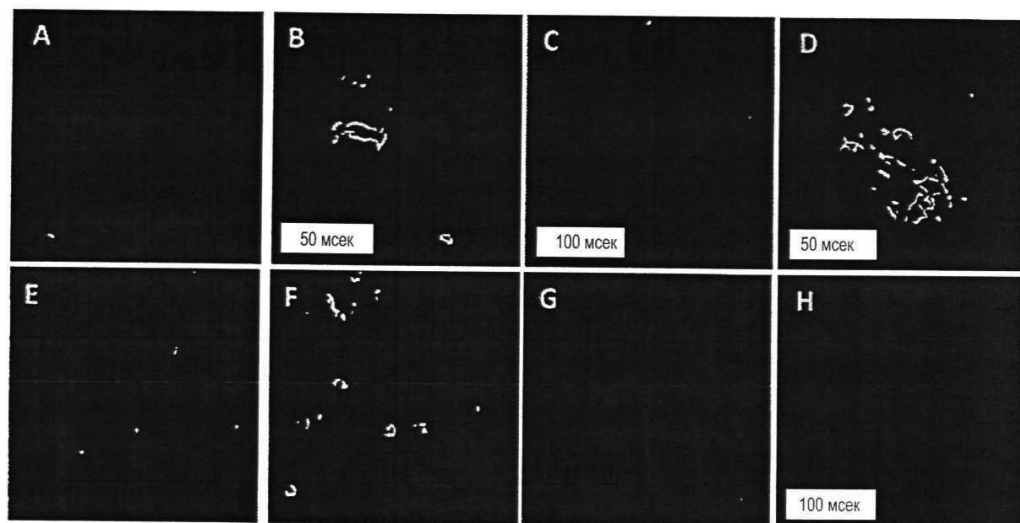


Фиг. 13

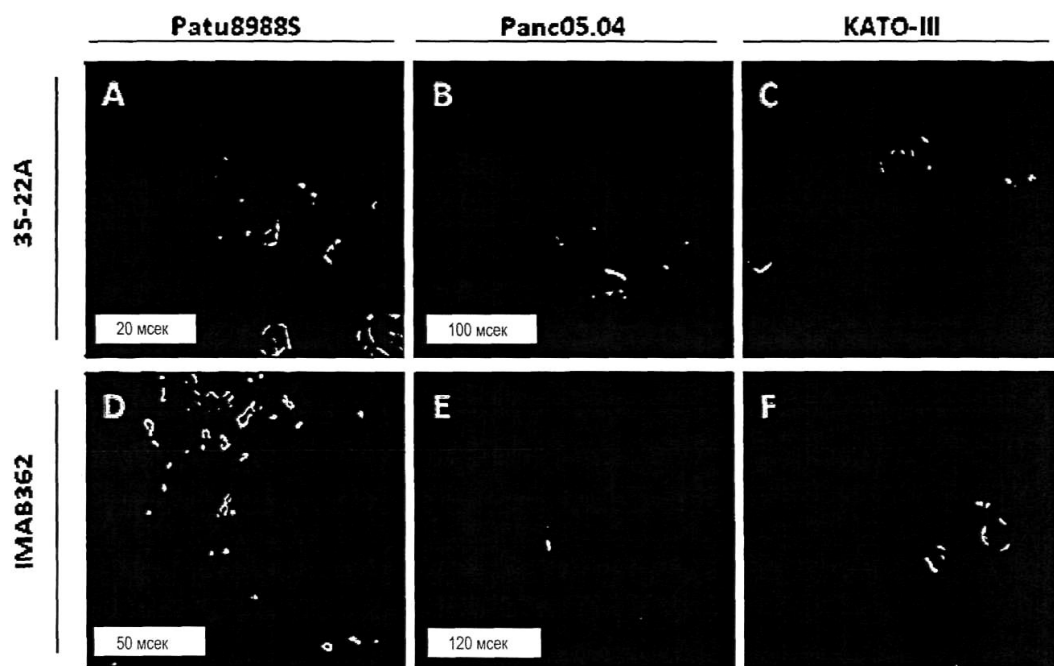


Фіг. 14

LVT-лінії клітин  
35-22A

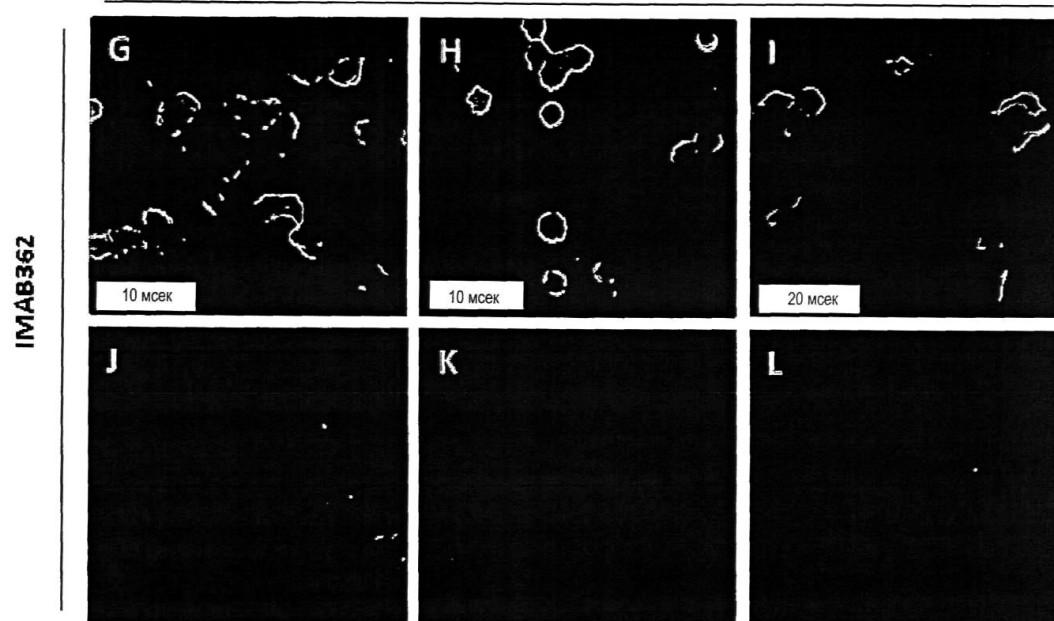


Фіг. 15



Фіг. 16

LVT-лінії клітин



Фіг. 16 (продовження )

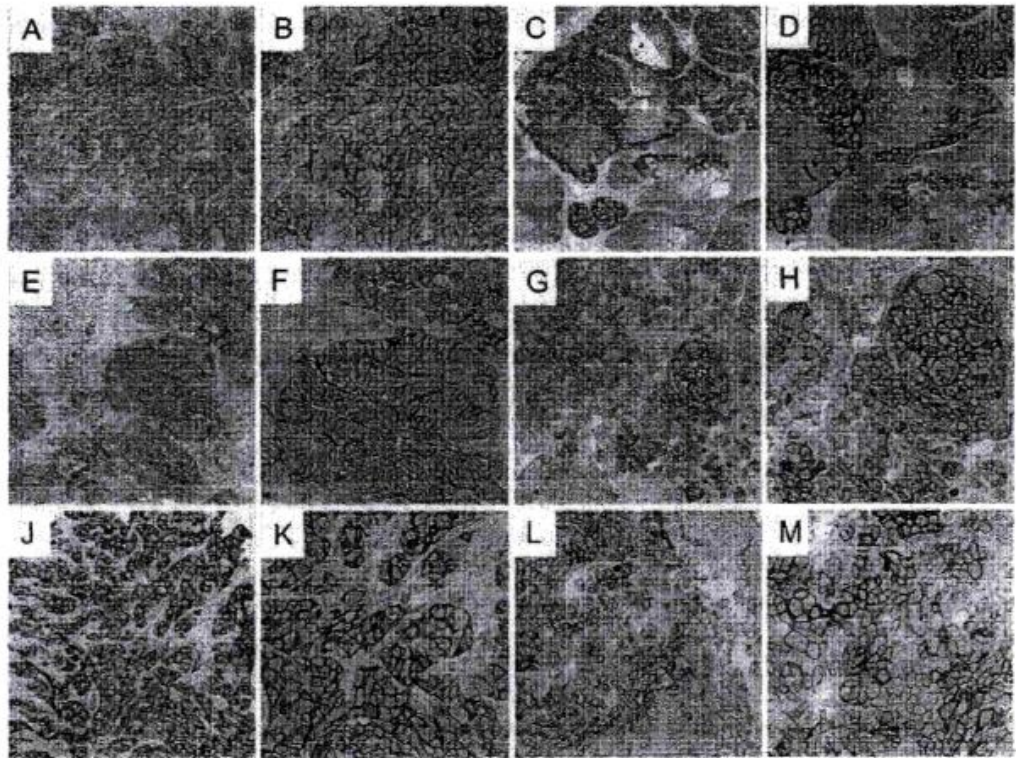


Fig. 17

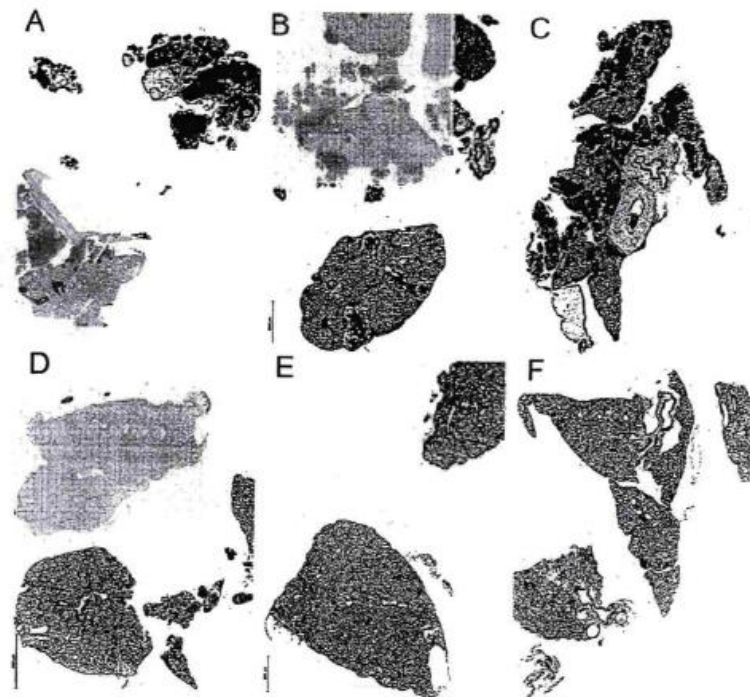
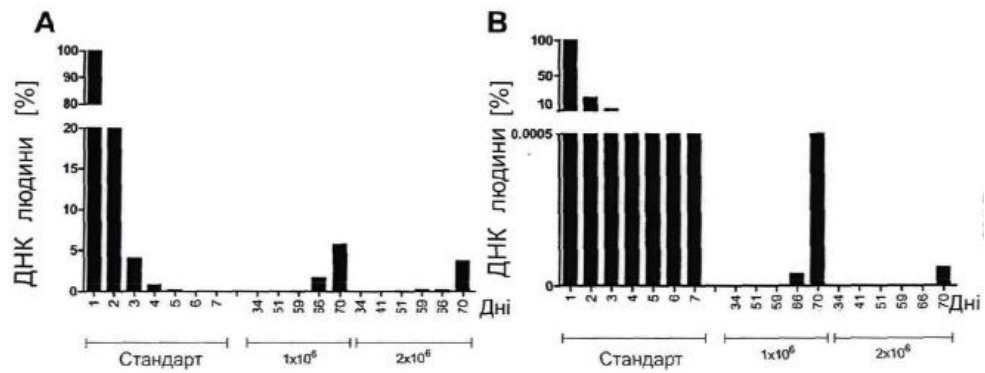
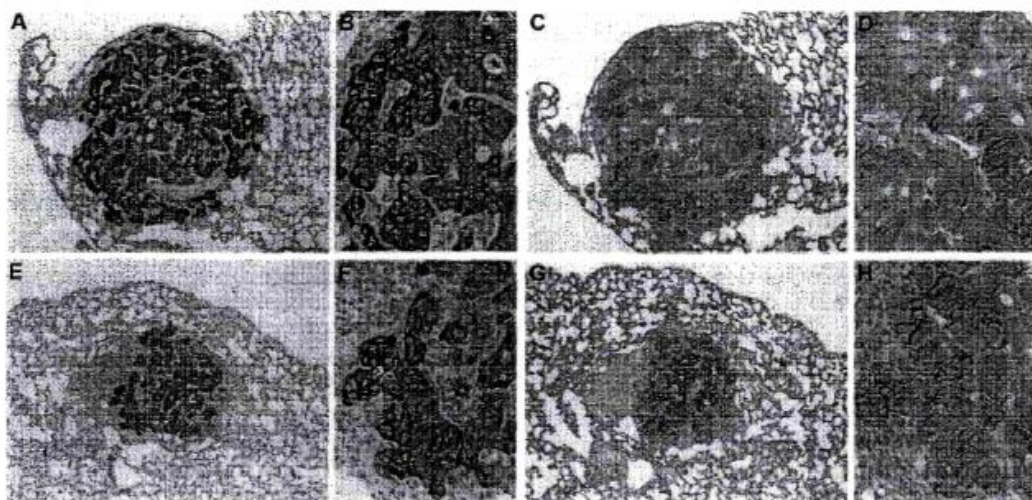


Fig. 18

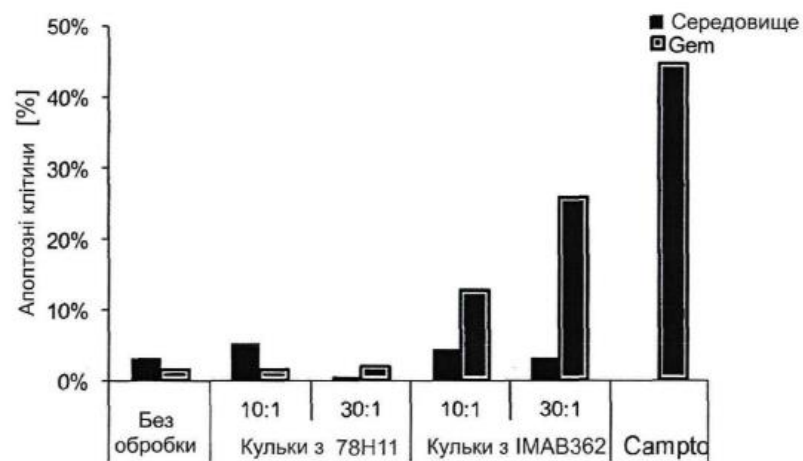




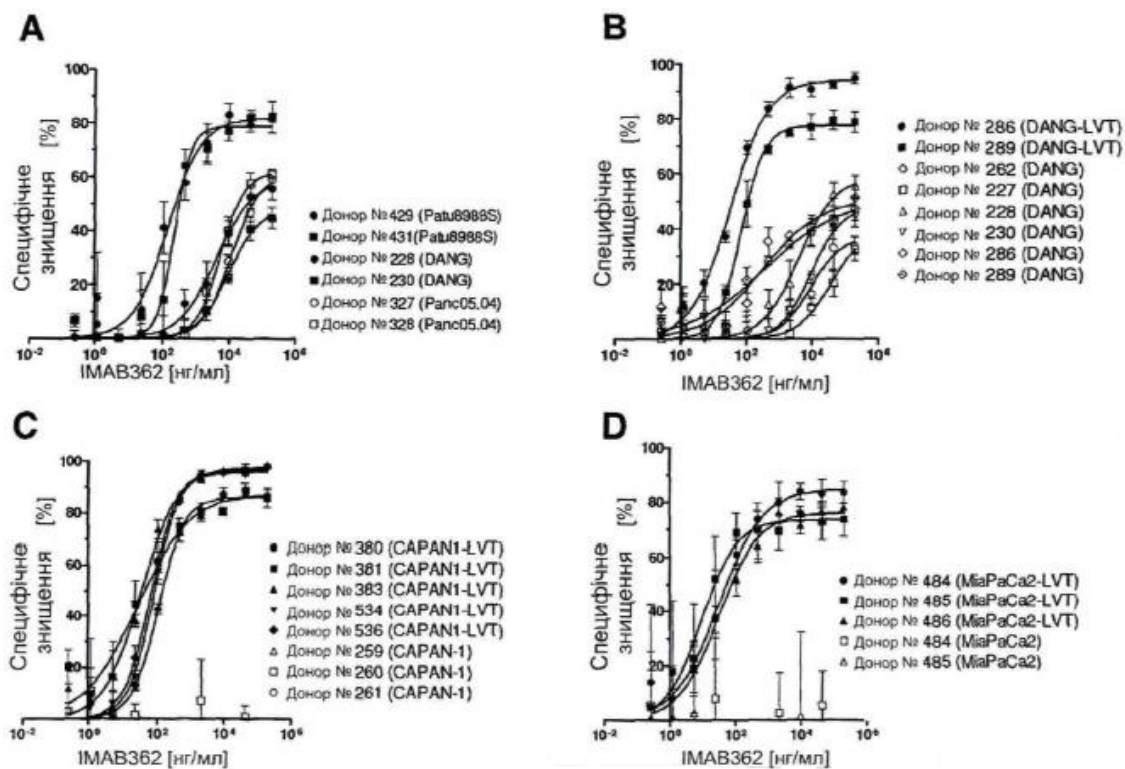
Фіг. 19



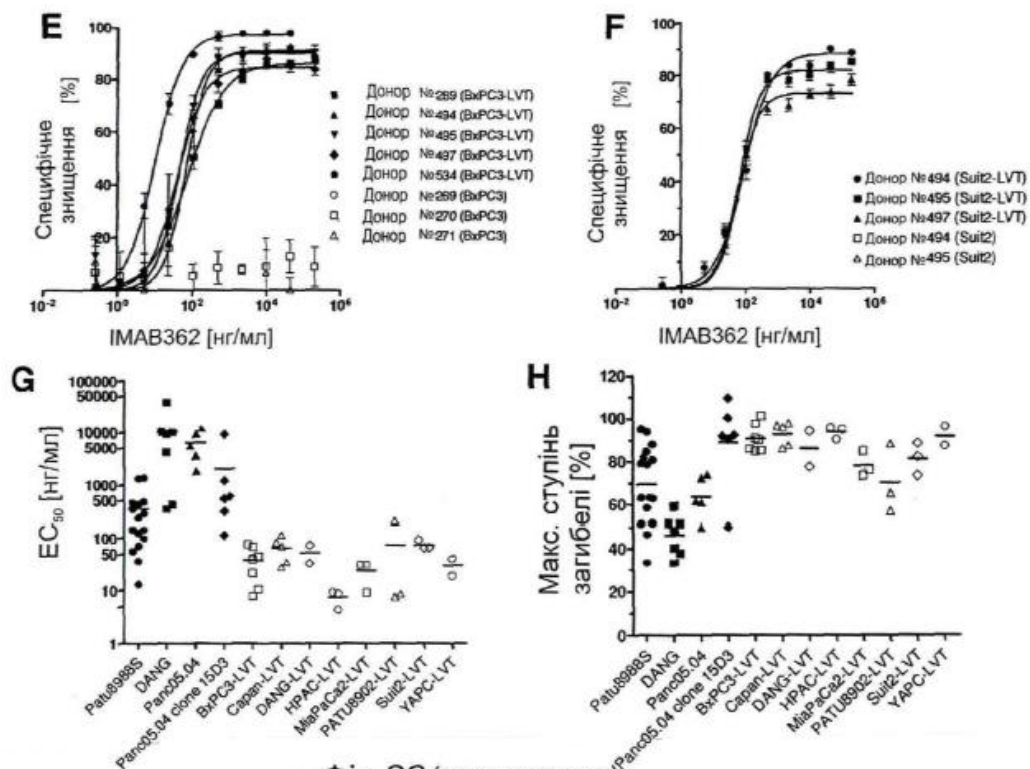
Фіг. 20



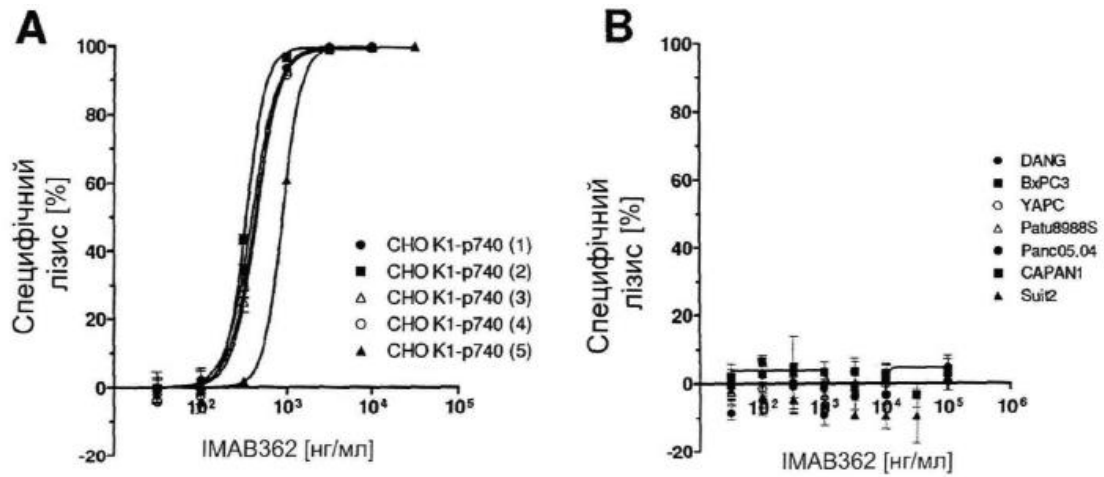
Фіг. 21



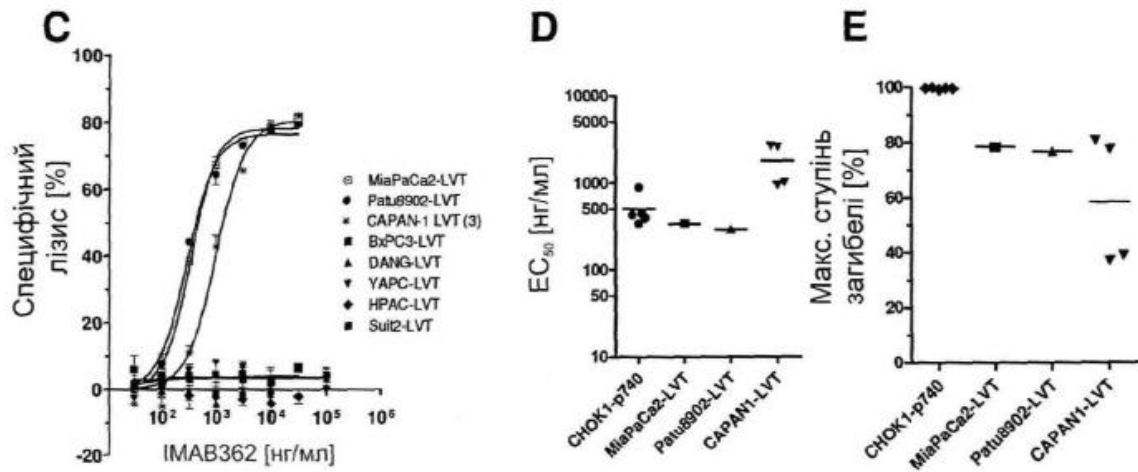
Фіг. 22



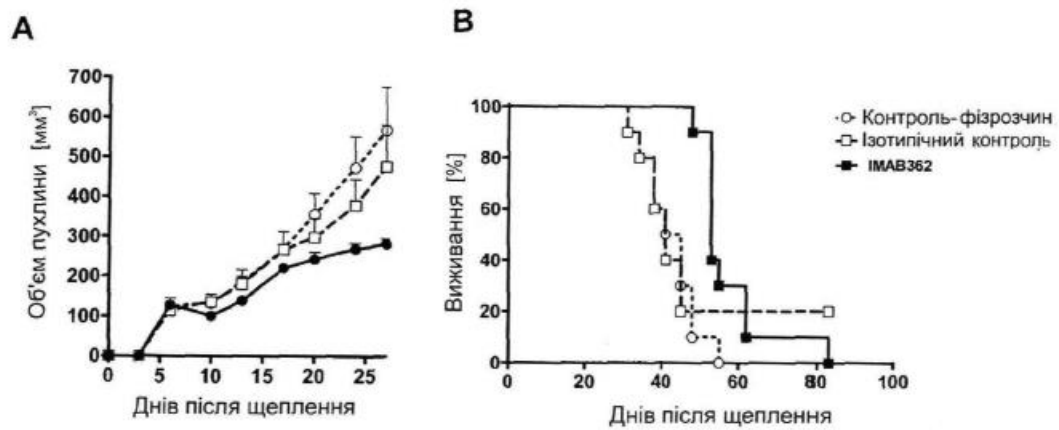
Фіг. 22 (продовження)



Фіг. 23

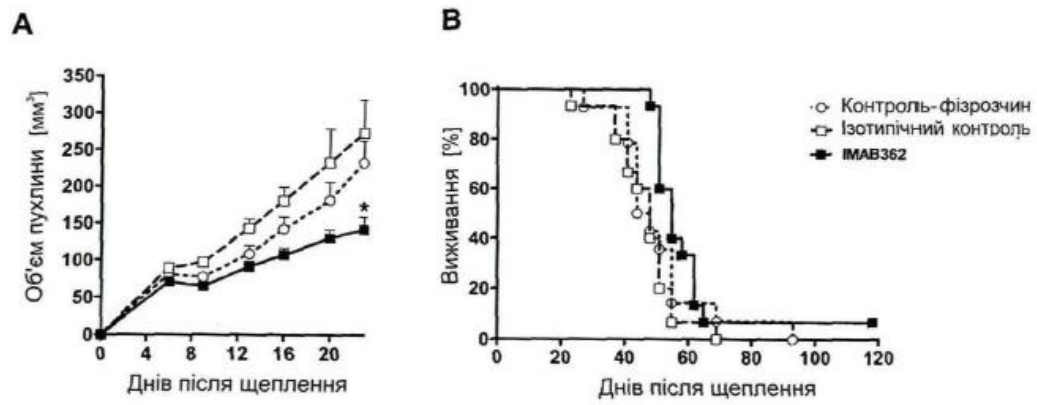


Фіг. 23 (продовження)

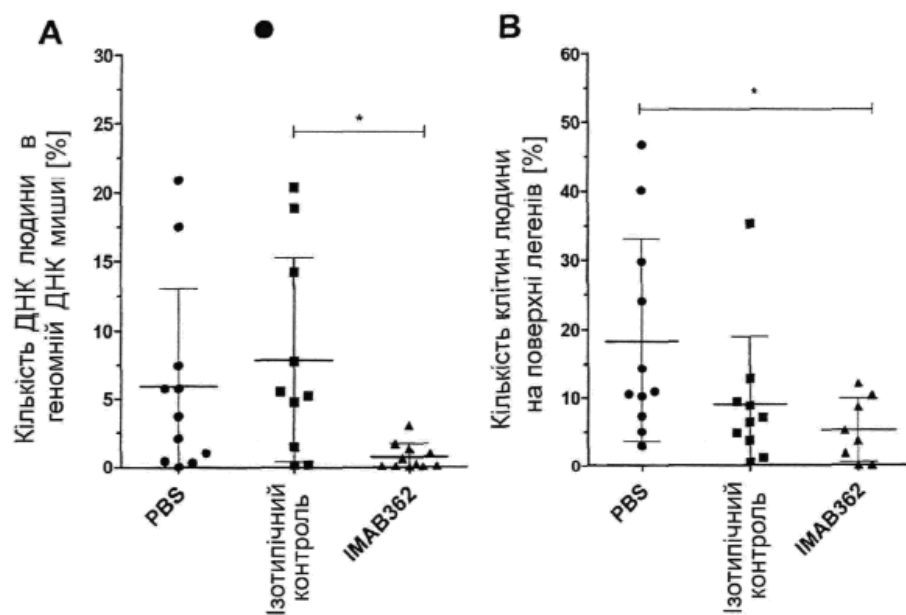


Фіг. 24

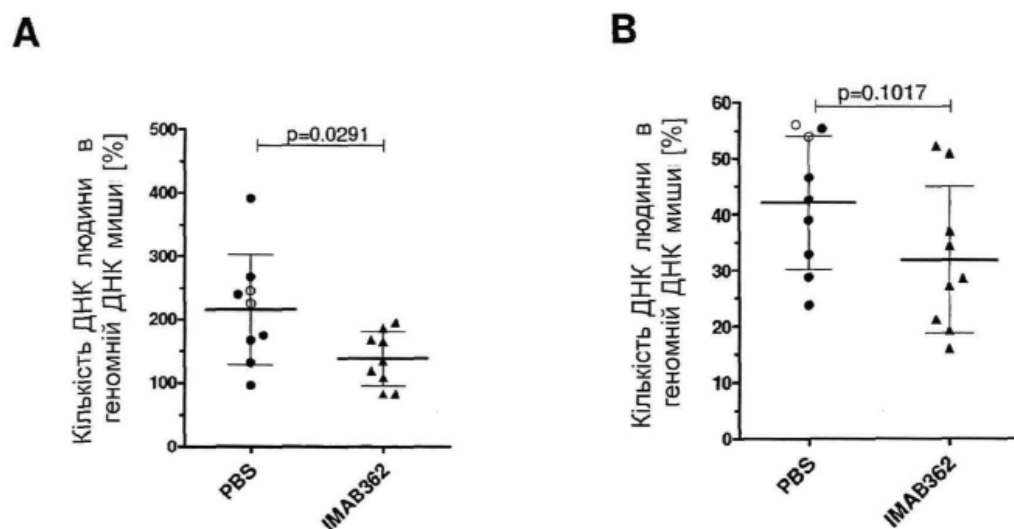




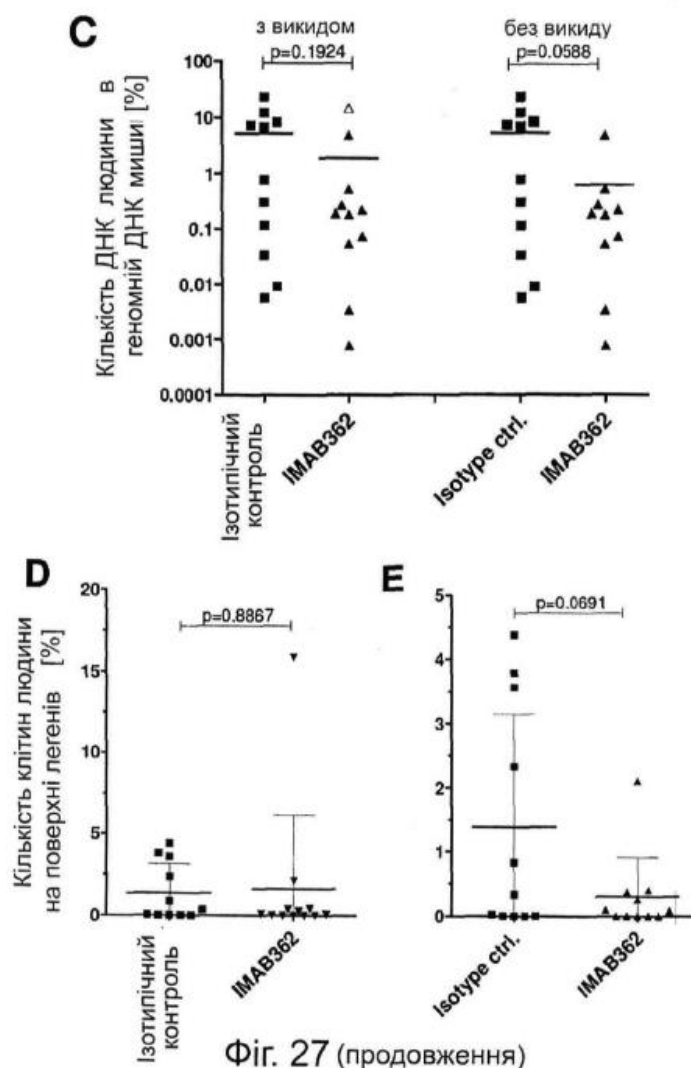
Фіг. 25

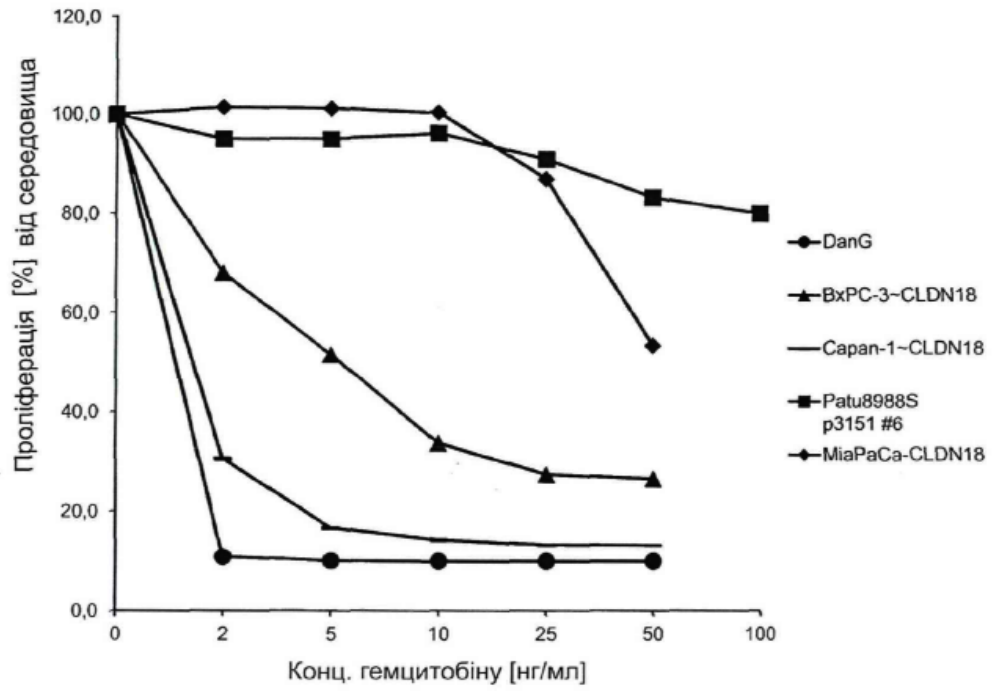


Фіг. 26

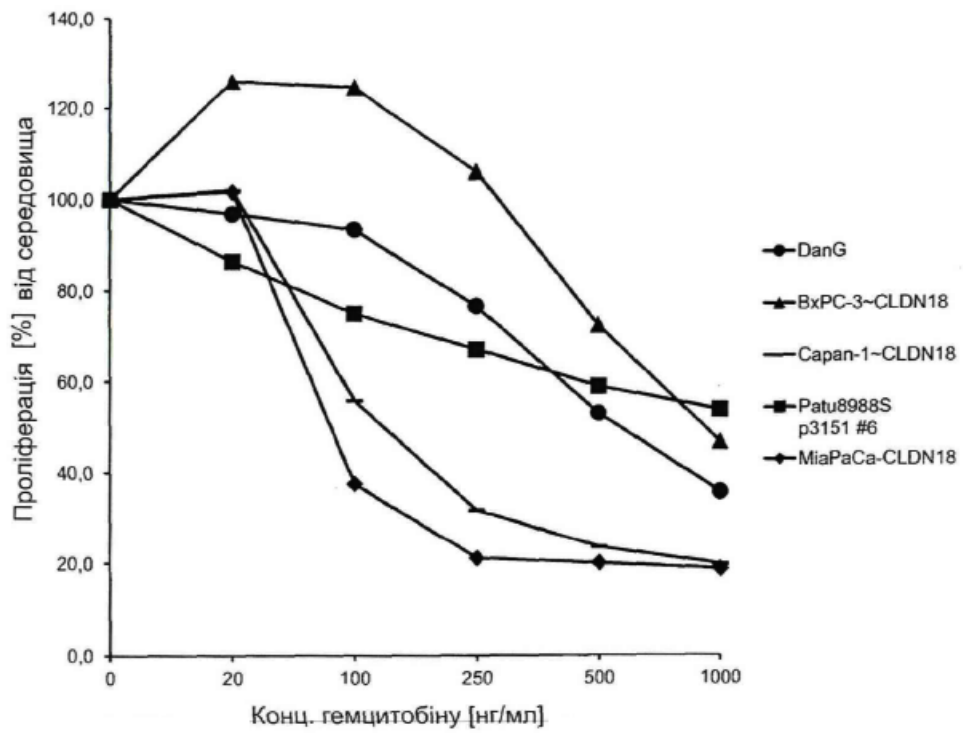


Фіг. 27

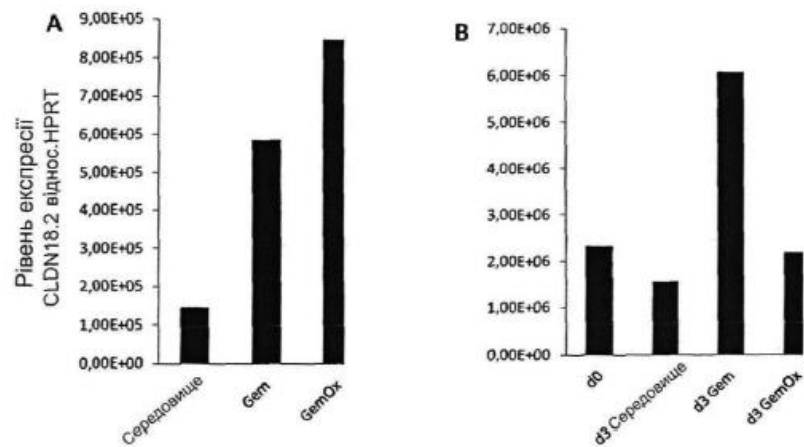




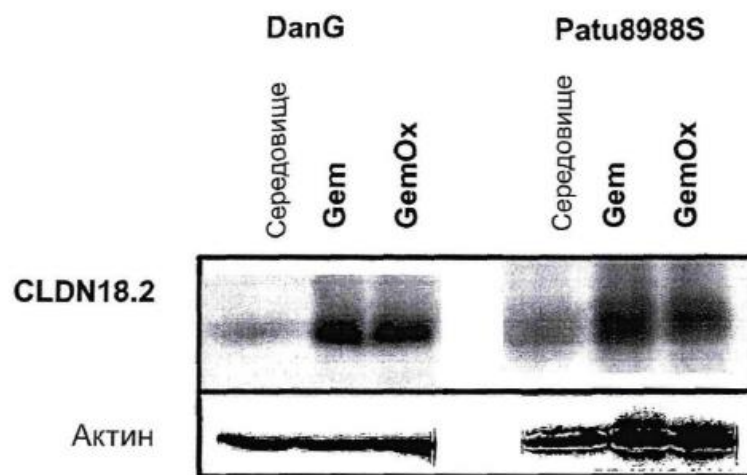
Фіг. 28



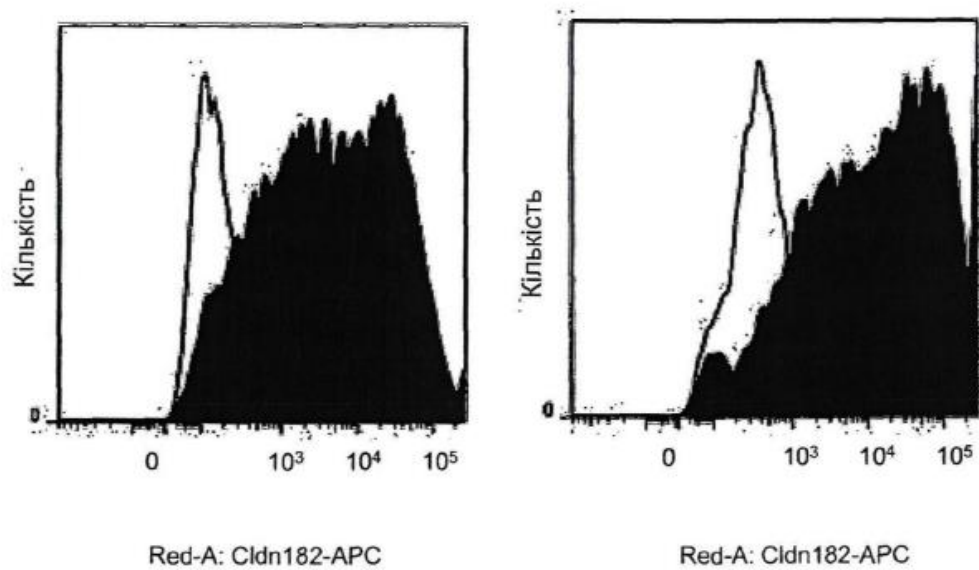
Фіг. 29



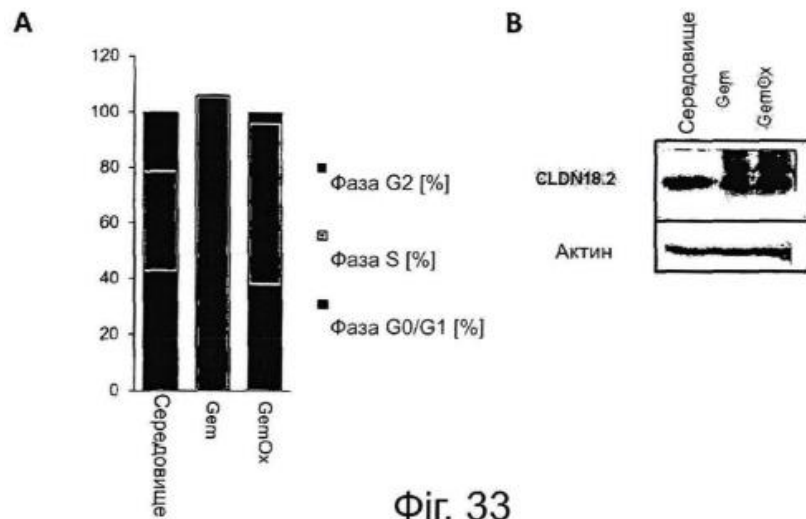
Фіг. 30



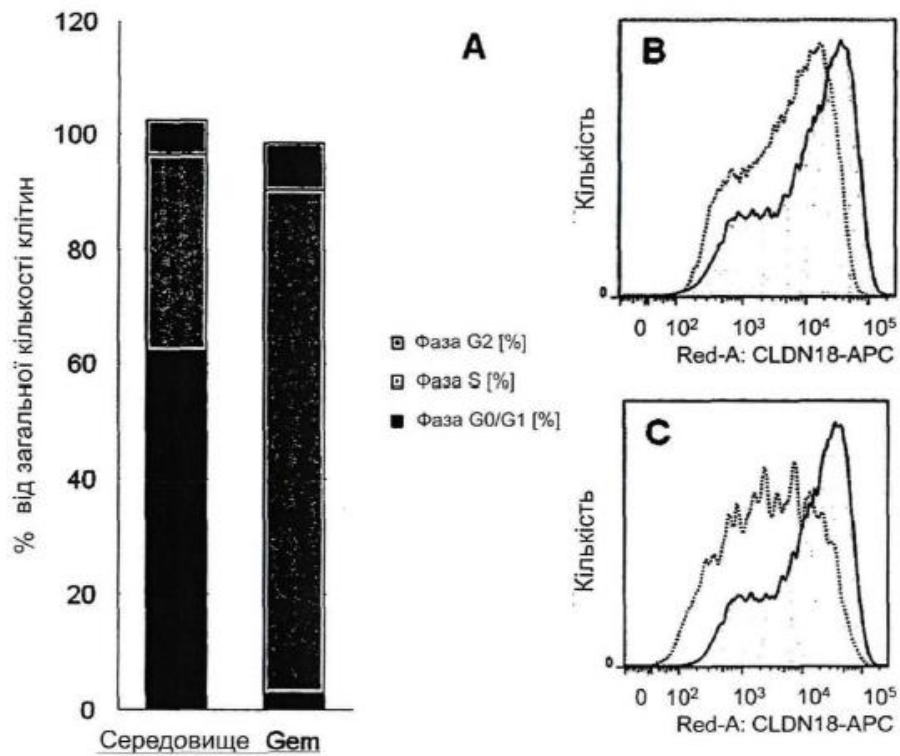
Фіг. 31



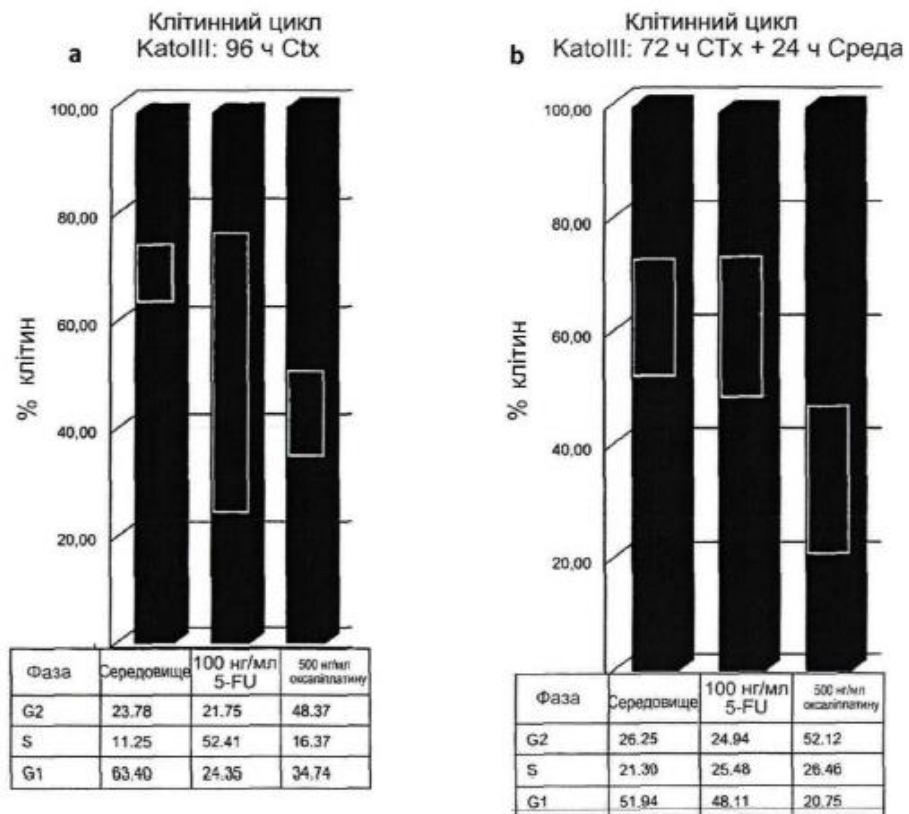
Фіг. 32



Фіг. 33

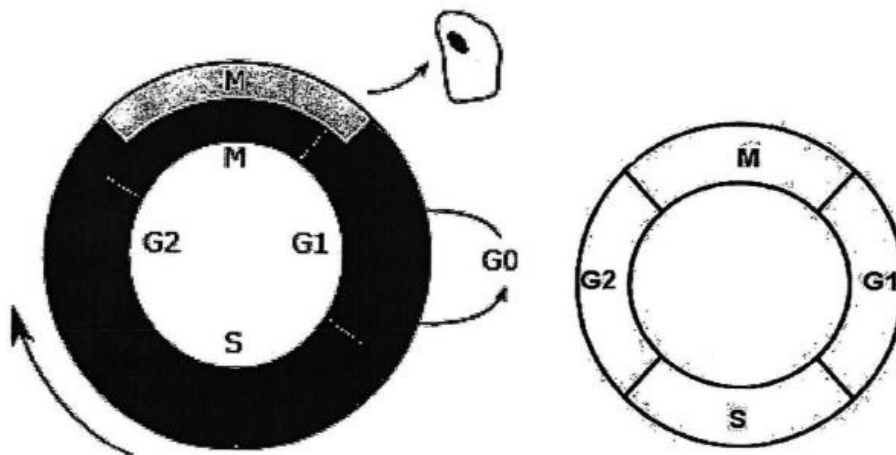


Фіг. 34

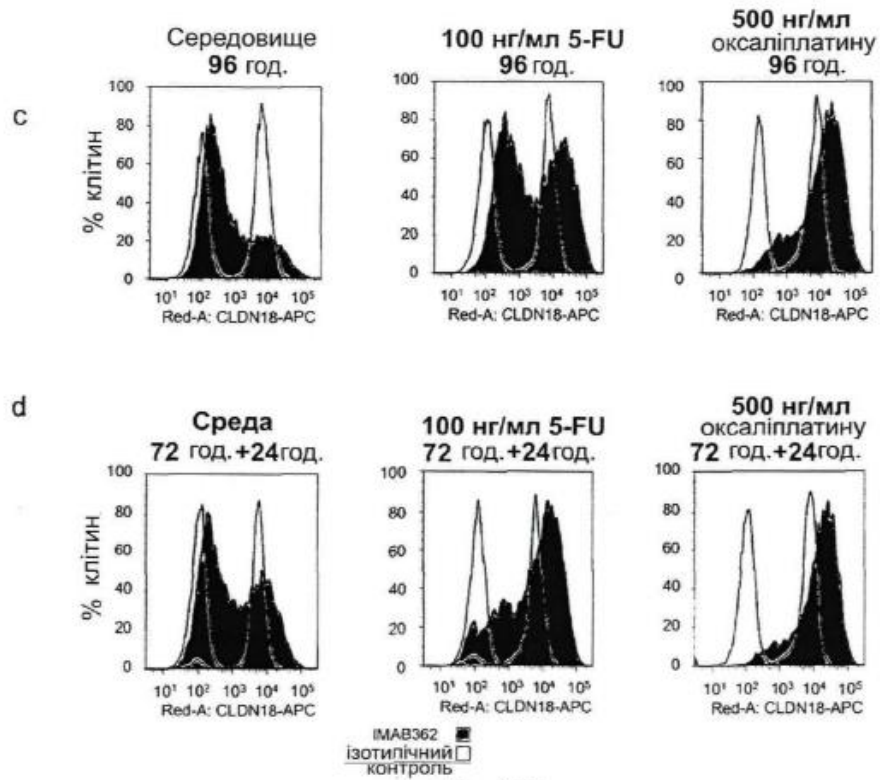


Фіг. 35

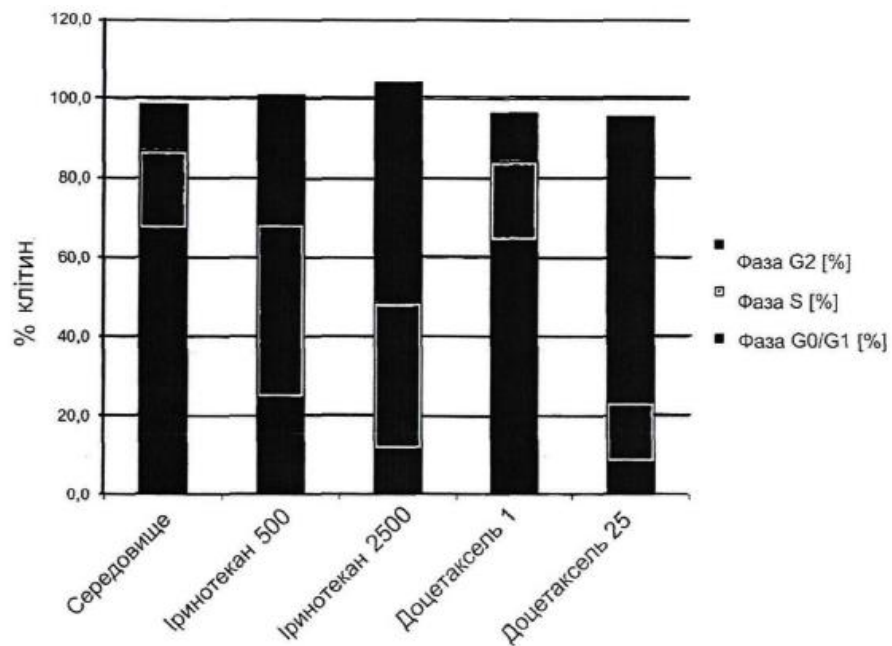
Продовження а/б



Фіг. 35

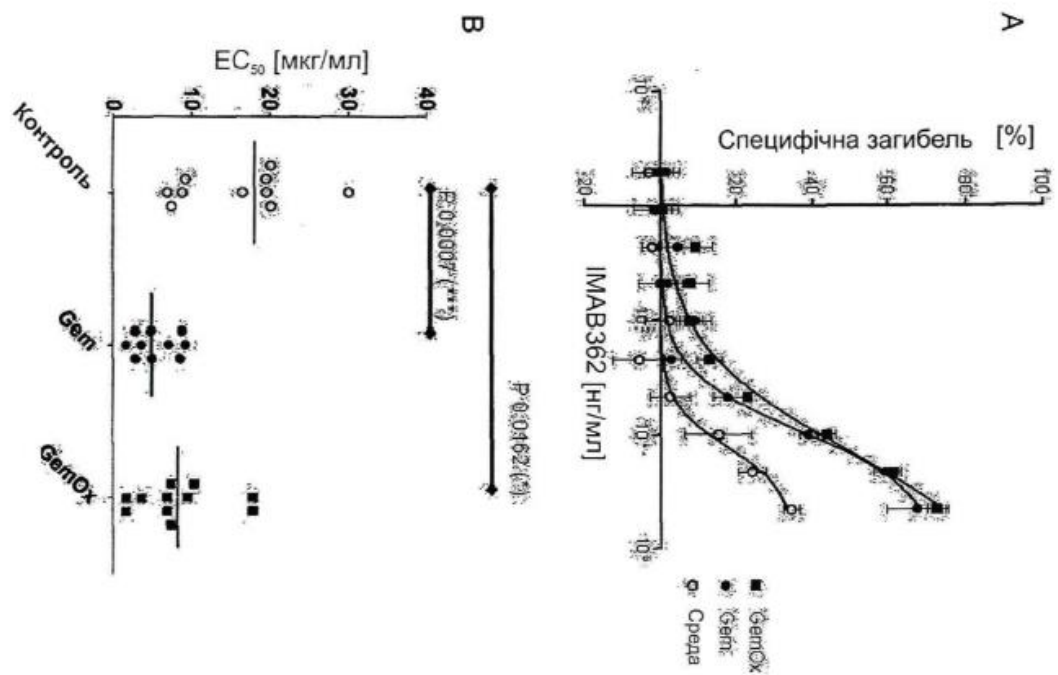


Фіг. 35 (продовження)

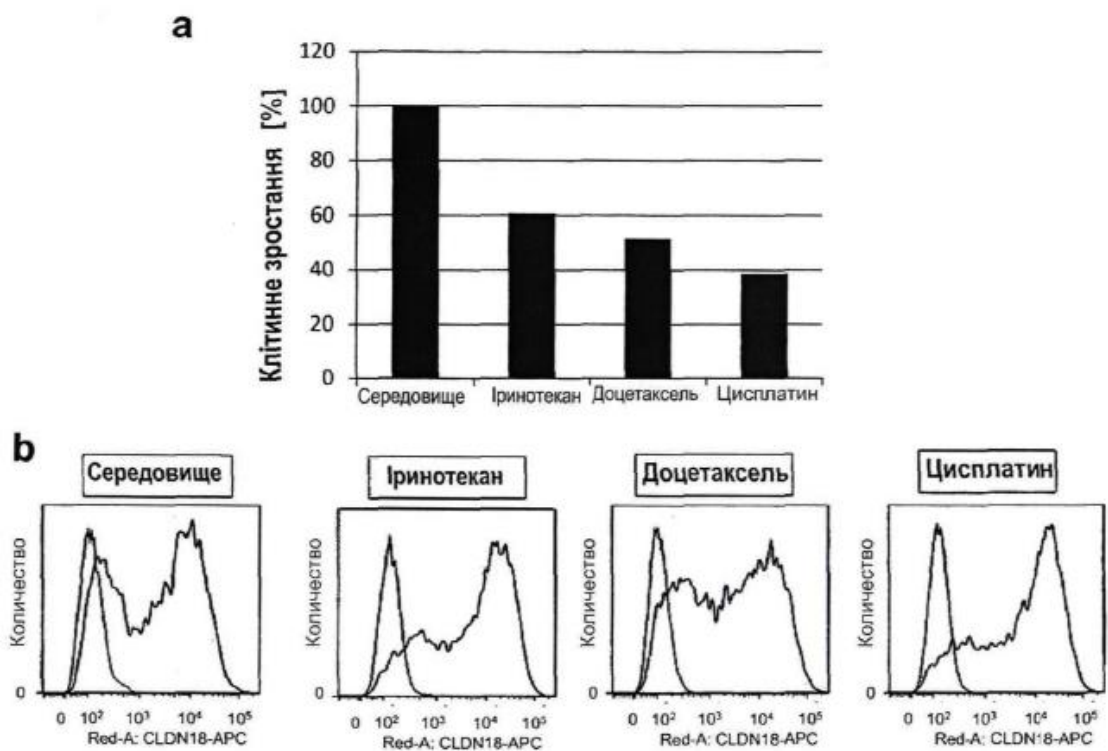


Фіг. 36





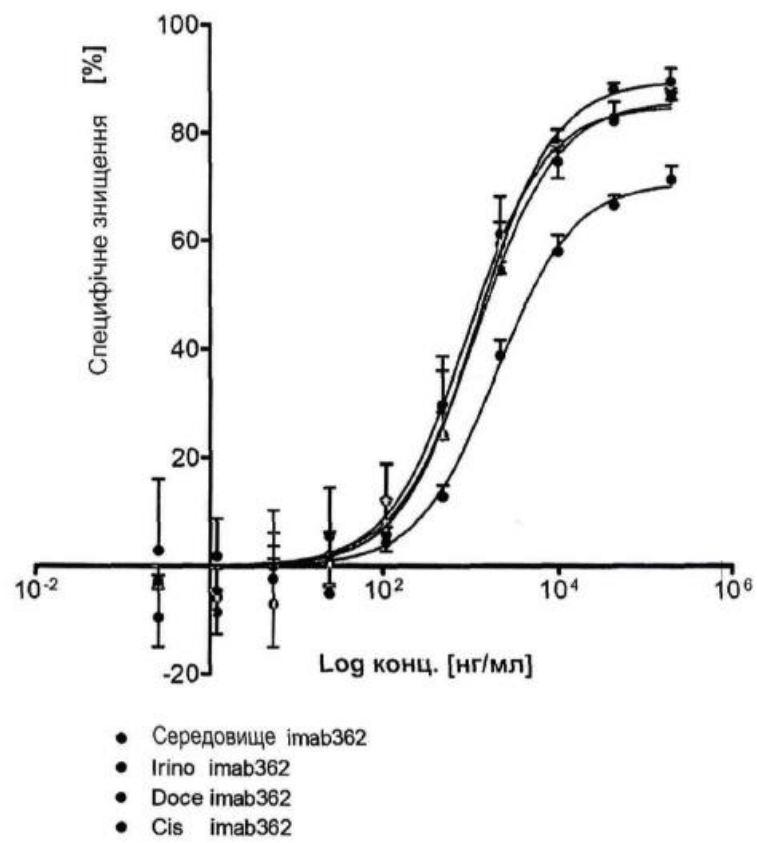
Фіг. 37



Фіг. 38

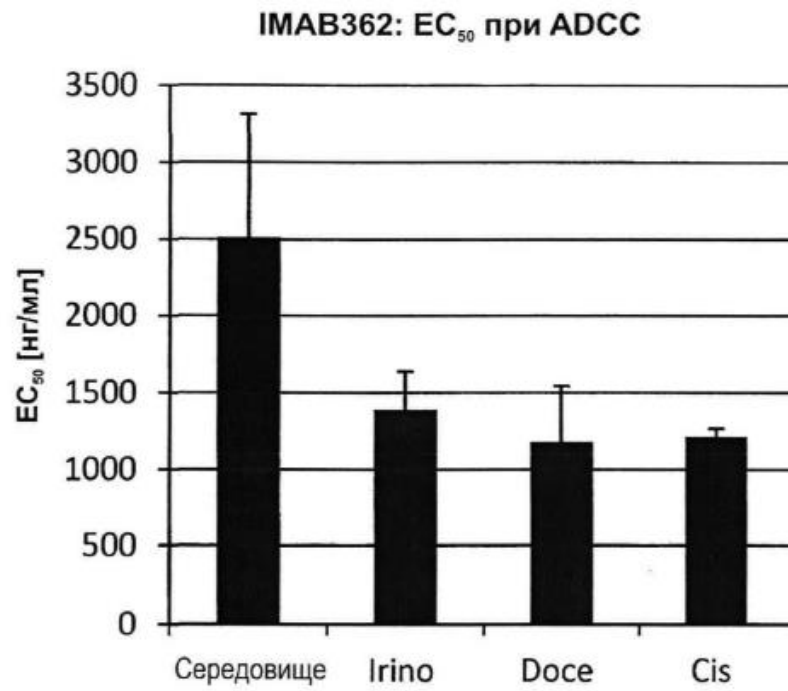


**с**

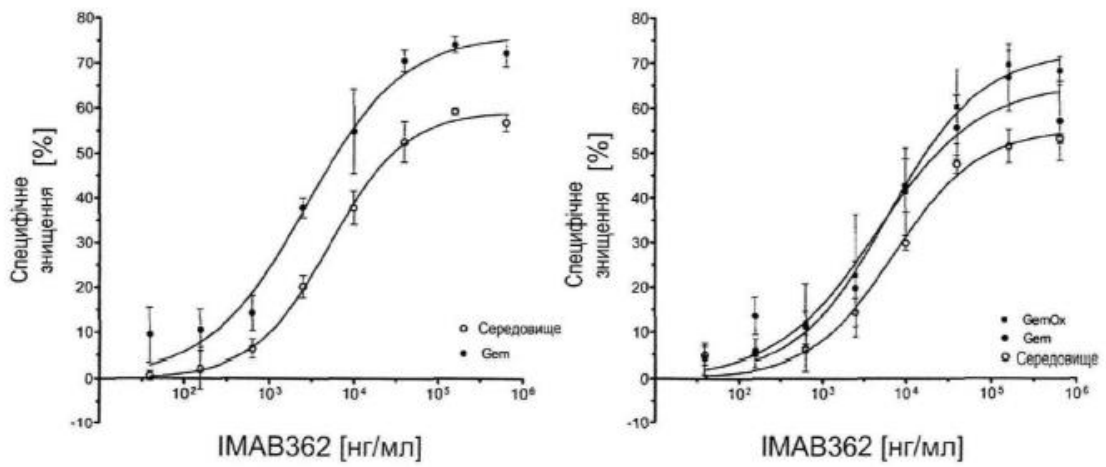


Фіг. 38 (продовження)

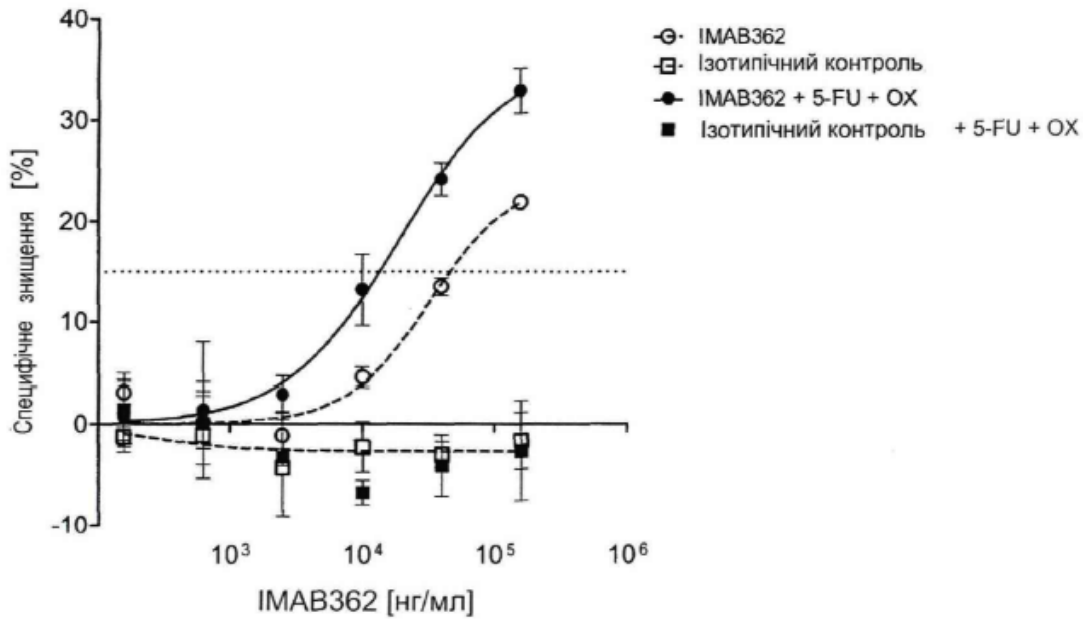
d



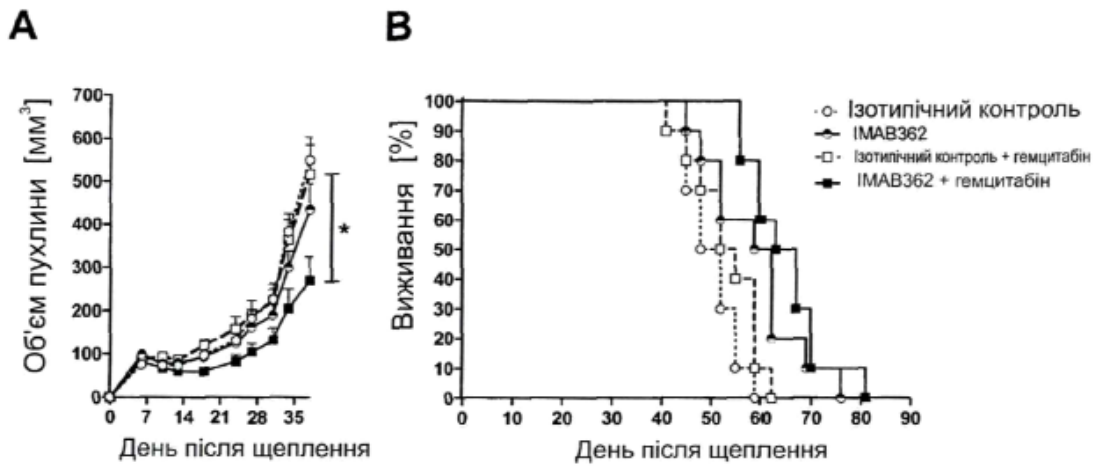
Фіг. 38 (продовження)



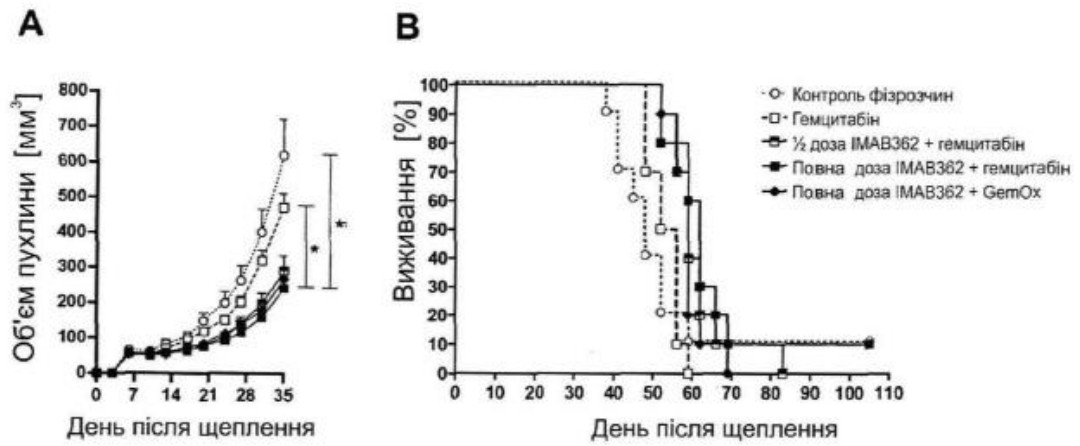
Фіг. 39



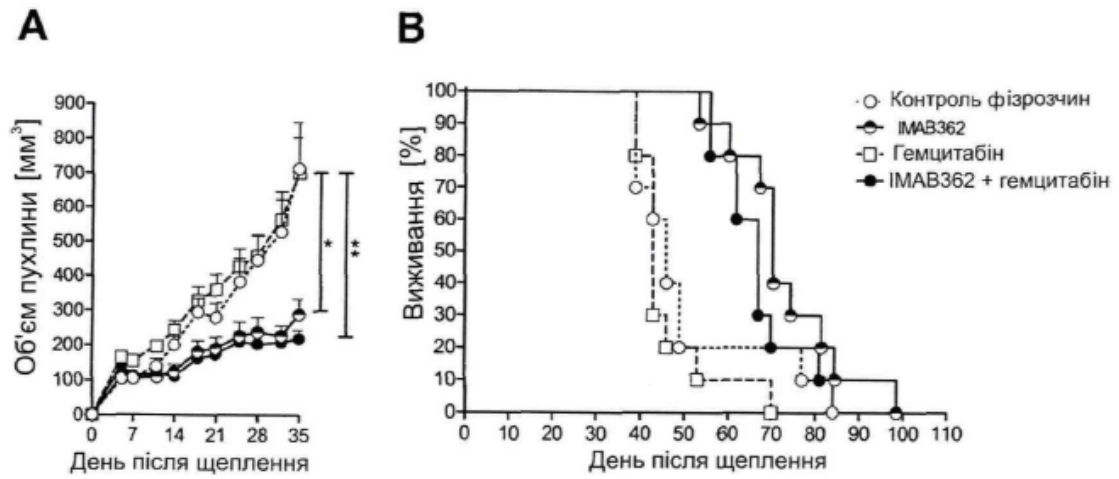
Фіг. 40



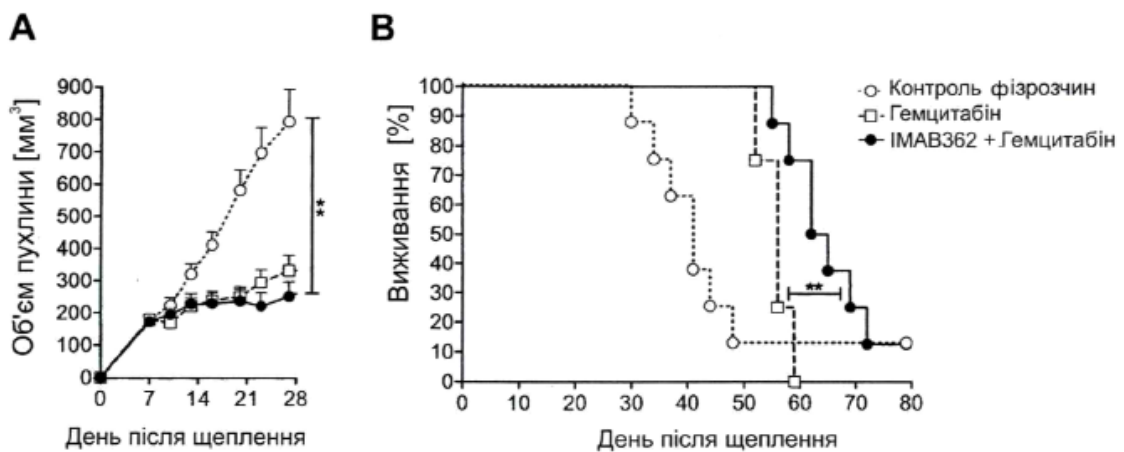
Фіг. 41



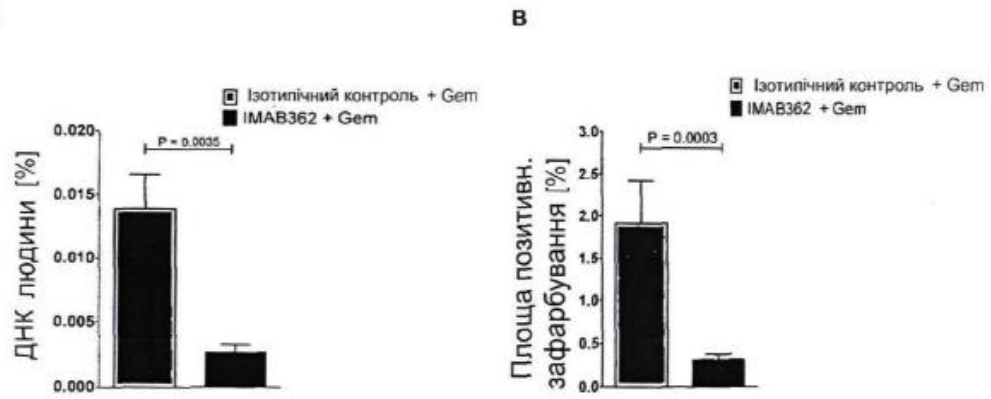
Фіг. 42



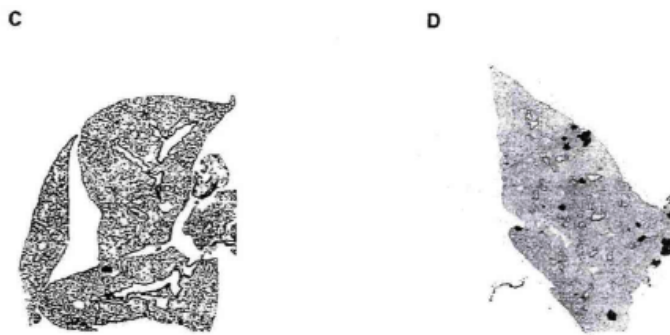
Фіг. 43



Фіг. 44



Фіг. 45



Фіг. 45 (продовження)

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601