



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119036** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

C07K 16/28 (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2015 10107	(72) Винахідник(и):	Сахін Угур (DE), Тюречі Езлем (DE)
(22) Дата подання заявки:	17.03.2014	(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)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.04.2019	(74) Представник:	Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	РСТ/ЕР2013/000817	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2007059997 A1, 31.05.2007 Claudin-18 Splice Variant 2 Is a Pan-Cancer Target Suitable for Therapeutic Antibody Development / Ugur Sahin, Michael Koslowski, Karl Dhaene et al. // Clinical Cancer Research. – 2008. - Vol. 14 (23). - P. 7624-7634 Highly Specific Auto-Antibodies against Claudin-18 Isoform 2 Induced by a Chimeric HBcAg Virus-Like Particle Vaccine Kill Tumor Cells and Inhibit the Growth of Lung Metastases / Thorsten Klamp, Jens Schumacher, Georg Huber et al. // Cancer Research. – 2011. - Vol. 71 (2). - P. 516-527
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.03.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	ЕР		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.01.2016, Бюл.№ 2		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2019, Бюл.№ 8		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/ЕР2014/000719, 17.03.2014		

(54) ТЕРАПІЯ РАКУ, ЯКА ВКЛЮЧАЄ АНТИТІЛО ПРОТИ КЛАУДИНУ 18.2**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу лікування ракового захворювання у пацієнта, уникаючи несприятливих явищ ступенів 4 і 5, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, у дозі, від 300 мг/м² до 1000 мг/м². Також винахід стосується способу визначення відповіді ракового пацієнта на лікування ракового захворювання, що включає введення антитіла, яке зв'язується з CLDN18.2, та способу визначення сприйнятливості ракового пацієнта на лікування ракового захворювання.

UA 119036 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід у цілому забезпечує терапію для ефективного лікування й/або попередження захворювань, пов'язаних із клітинами, які експресують CLDN18.2, зокрема, таких ракових захворювань, як гастроезофагеальний рак.

5 Рівень техніки

Рак шлунка й стравоходу (гастроезофагеальний; GE) відноситься до злоякісних пухлин, вирішення проблеми лікування яких є незадовільним. Рак шлунка є другою за поширеністю причиною смерті від злоякісних новоутворень в усьому світі. За останні десятиліття збільшилася захворюваність на рак стравоходу, що супроводжується зміщенням гістологічного типу й локалізації первинної пухлини. На даний час аденокарцинома стравоходу є більш поширеною, ніж сквамозно-клітинна карцинома в США й Західній Європі, при цьому більшість пухлин локалізується в дистальному відділі стравоходу. Показник загального виживання протягом п'яти років для GE рака становить 20-25 % незалежно від агресивності встановленої стандартної терапії, пов'язаної зі значними побічними ефектами.

15 Більшість пацієнтів на момент звернення за медичною допомогою мають місцево-поширене або метастатичне захворювання й повинні бути піддані хіміотерапії першої лінії. В основу режимів лікування покладено похідні платини й фторпіримідину, головним чином у комбінації із третьою сполукою (наприклад, таксаном або антрациклінами). Однак найкраще, що можна очікувати, є середнє виживання без прогресування захворювання від 5 до 7 місяців і середнє загальне виживання від 9 до 11 місяців.

20 Відсутність значної користі від різних комбінованих режимів хіміотерапії нового покоління для цих видів раку підштовхнуло до дослідження застосування таргетних агентів. Нещодавно трастузумаб був схвалений для Her2/neu-позитивних типів гастроезофагеального рака. Однак, оскільки лише ~20 % пацієнтів експресують мішень і для них придатне дане лікування, потреба в галузі медицини усе ще залишається високою.

25 Молекула щільних контактів, клаудин-18, сплайсований варіант 2, (клаудин 18.2 (CLDN18.2)) є членом родини клаудинів, білків щільних контактів. CLDN18.2 є трансмембранним білком з молекулярною масою 27,8 кДа, який містить чотири трансмембранні домени із двома малими позаклітинними петлями.

30 У нормальних тканинах відсутня детектована експресія CLDN18.2 за даними ПЛР-ЗТ, за винятком шлунка. Імуногістохімічний аналіз із використанням CLDN18.2-специфічних антитіл показує, що шлунок є єдиною позитивною тканиною.

35 CLDN18.2 є високоселективним шлунковим лінійним антигеном, який експресується винятково на диференційованих короткоживущих клітинах епітелію шлунка. CLDN18.2 зберігається в процесі злоякісної трансформації й, таким чином, часто виявляється на поверхні клітин рака шлунка людини. Крім того, цей пан-пухлинний антиген ектопічно активується із значним рівнем в аденокарциномах стравоходу, підшлункової залози й легенів. Білок CLDN18.2 також локалізується в метастазах у лімфовузлах аденокарциноми раку шлунка й у віддалених метастазах, особливо в яєчниках (так званій пухлині Крукенберга).

40 IMAB362 є химерним антитілом IgG1, спрямованим проти CLDN18.2, яке було розроблене компанією Ganymed Pharmaceuticals A IMAB362 з високою афінністю й специфічністю розпізнає перший позаклітинний домен (ECD1) CLDN18.2. IMAB362 не зв'язується з будь-якими іншими членами родини клаудинів, включаючи близькоспоріднений сплайсований варіант 1 клаудина-18 (CLDN18.1). IMAB362 демонструє чотири точні незалежні високоактивні механізми дії відносно специфічності до пухлинних клітин і вузлів. При зв'язуванні з мішенню IMAB362 опосередковує знищення клітин за допомогою ADCC, CDC і індукції апоптоза, викликаного поперечним зшиванням мішені на поверхні пухлинних клітин, і прямого інгібування проліферації. Таким чином, IMAB362 ефективно лізує CLDN18.2-позитивні клітини, включаючи людські клітинні лінії раку шлунка *in vitro* і *in vivo*. Миші, які несуть CLDN18.2-позитивні лінії ракових клітин, мають переваги за виживанням й до 40 % мишей демонструють регресію своїх пухлин при лікуванні за допомогою IMAB362.

50 Токсичність і РК/ТК (фармакокінетичний/токсикокінетичний) профіль IMAB362 ретельно вивчали на мишах і маках-крабодідах, включаючи дослідження з визначення діапазону доз, 28-денні дослідження токсичності багаторазових доз на маках-крабодідах і 3-місячне дослідження токсичності багаторазових доз на мишах. Багаторазові дози IMAB362 при внутрішньовенному введенні (*i.v.*) добре переносилися мишами (саме тривале лікування шляхом щотижневого введення протягом 3 місяців, найвищі рівні доз склали 400 мг/кг) і маками-крабодідами (до 5 щотижневих застосувань аж до 100 мг/кг). Ознак системної або місцевої токсичності не відзначалося. Зокрема, шлункової токсичності не спостерігалось в будь-якому дослідженні токсичності. IMAB362 не викликає активації імунної системи й вивільнення цитокінів. Побічних

ефектів на чоловічі й жіночі репродуктивні органи не відзначалося. IMAV362 не зв'язується із тканинами, позбавленими мішені. Дослідження біорозподілення в мишей показують, що причина відсутності шлункової токсичності, очевидно, пов'язана з компартименталізацією щільних контактів у люмінальній ділянці здорового епітелію шлунка, що, як виявилось, значно погіршує доступність епітопа IMAV362. Ця компартименталізація втрачається при злоякісній трансформації, роблячи епітоп, який піддається впливу IMAV362.

У даному документі представлені дані, які демонструють, що введення антитіла до CLDN18.2, такого як IMAV362, пацієнтові-людині з гастроезофагеальним раком є безпечним і добре переноситься аж до дози, яка складає, щонайменше, 1000 мг/м². Крім того, дані, представлені тут, демонструють, що антитіло є повністю функціональним у цих пацієнтів для впливу проти пухлинних клітин, і надано докази протипухлинної активності.

Розкриття винаходу

У даному винаході в цілому пропонується ефективна терапія й/або попередження захворювань, пов'язаних із клітинами, які експресують CLDN18.2, включаючи такі ракові захворювання, як рак шлунка, рак стравоходу, рак підшлункової залози, рак легенів, такий як недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), рак яєчника, рак товстої кишки, рак печінки, рак голови й шиї, і рак жовчного міхура, а також їх метастази, зокрема, метастази раку шлунка, такі як пухлини Крукенберга, перитонеальні метастази й метастази в лімфовузлах. Переважно раковими захворюваннями є аденокарцинома шлунка, стравоходу, протоків підшлункової залози, жовчних протоків, легенів і яєчника.

У першому аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці, щонайменше, 40 мкг/мл. В інших варіантах здійснення антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці, щонайменше, 50 мкг/мл, щонайменше, 150 мкг/мл, щонайменше, 300 мкг/мл, щонайменше, 400 мкг/мл або, щонайменше, 500 мкг/мл. У різних варіантах здійснення антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці не більше 800 мкг/мл, 700 мкг/мл, 600 мкг/мл, 550 мкг/мл або 500 мкг/мл. В одному варіанті здійснення забезпечується рівень у сироватці у діапазоні від 40 мкг/мл до 700 мкг/мл, бажано від 40 мкг/мл до 600 мкг/мл, бажано від 50 мкг/мл до 500 мкг/мл, такий як від 150 мкг/мл до 500 мкг/мл або від 300 мкг/мл до 500 мкг/мл. Під терміном "рівень у сироватці", який використовується в даному описі, розуміють концентрацію описаної речовини в сироватці крові. В одному варіанті здійснення забезпечується рівень у сироватці, який зберігається протягом, щонайменше, 7 днів або, щонайменше, 14 днів. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає введення дози/доз антитіла, щонайменше, 300 мг/м², наприклад, щонайменше, 600 мг/м² і бажано аж до 1500 мг/м², до 1200 мг/м² або до 1000 мг/м².

У другому аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому антитіло вводять у дозі, щонайменше, 300 мг/м², наприклад, щонайменше, 600 мг/м² і бажано аж до 1500 мг/м², аж до 1200 мг/м² або аж до 1000 мг/м².

У третьому аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому щонайменше 50 %, бажано 60 %, 70 %, 80 % або 90 % ракових клітин пацієнта є CLDN18.2-позитивними, і/або щонайменше 40 %, бажано 50 % або 60 % ракових клітин пацієнта є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2. У цьому аспекті в даному винаході також пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, при цьому зазначений спосіб передбачає: а. ідентифікацію пацієнта, який має щонайменше 50 %, бажано 60 %, 70 %, 80 % або 90 % CLDN18.2-позитивних ракових клітин і/або щонайменше 40 %, бажано 50 % або 60 % ракових клітин, які є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2; і б. введення зазначеному пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2. В одному варіанті здійснення, щонайменше, 95 % або, щонайменше, 98 % ракових клітин пацієнта є CLDN18.2-позитивними. В одному варіанті здійснення щонайменше 70 %, щонайменше 80 % або щонайменше 90 % ракових клітин пацієнта є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2.

В одному варіанті здійснення способу за кожним з аспектів, описаних тут, лікування ракового захворювання призводить до досягнення стабілізації перебігу захворювання. В одному варіанті здійснення досягається стабілізація перебігу захворювання, яка зберігається протягом, щонайменше, 2 місяців, щонайменше, 3 місяців або, щонайменше, 6 місяців.

У четвертому аспекті в даному винаході пропонується спосіб досягнення стабілізації

перебігу захворювання в ракового пацієнта, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2. В одному варіанті здійснення досягається стабілізація перебігу захворювання, яка зберігається протягом, щонайменше, 2 місяців, щонайменше, 3 місяців або, щонайменше, 6 місяців.

5 В одному варіанті здійснення способу за кожним з аспектів, описаних тут, антитіло вводять у вигляді одноразової дози або у вигляді багаторазових доз.

У п'ятому аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому антитіло вводять у вигляді багаторазових доз.

10 У випадку введення антитіла запропонованого винаходом у вигляді багаторазових доз, зазначене антитіло бажано вводять у вигляді щонайменше 3 доз, щонайменше 4 доз, щонайменше 5 доз, щонайменше 6 доз, щонайменше 7 доз, щонайменше 8 доз, щонайменше 9 доз або щонайменше 10 доз і бажано до 30, 25, 20, 15 або 10 доз. Дози антитіла бажано вводять через інтервали часу, які становлять щонайменше 7 днів, щонайменше 10 днів, щонайменше 14 днів або щонайменше 20 днів. Дози антитіла бажано вводять через інтервали часу, які становлять від 7 до 30 днів, від 10 до 20 днів і бажано близько 14 днів.

В одному варіанті здійснення способу за третім, четвертим або п'ятим аспектом антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці, щонайменше, 40 мкг/мл. В інших варіантах здійснення антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці, щонайменше, 50 мкг/мл, щонайменше 150 мкг/мл, щонайменше 300 мкг/мл, щонайменше 400 мкг/мл або щонайменше 500 мкг/мл. У різних варіантах здійснення антитіло вводять таким чином, щоб забезпечити рівень у сироватці не більше 800 мкг/мл, 700 мкг/мл, 600 мкг/мл, 550 мкг/мл або 500 мкг/мл. В одному варіанті здійснення забезпечується рівень у сироватці в діапазоні від 40 мкг/мл до 700 мкг/мл, бажано від 40 мкг/мл до 600 мкг/мл, бажано від 50 мкг/мл до 500 мкг/мл, наприклад, від 150 мкг/мл до 500 мкг/мл або від 300 мкг/мл до 500 мкг/мл. В одному варіанті здійснення забезпечується рівень у сироватці, який зберігається протягом, щонайменше, 7 днів або, щонайменше, 14 днів. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає введення дози/доз антитіла, яка складає, щонайменше, 300 мг/м^2 , а саме, щонайменше, 600 мг/м^2 і бажано до 1500 мг/м^2 , до 1200 мг/м^2 або до 1000 мг/м^2 .

30 В одному варіанті здійснення способу за кожним із зазначених вище аспектів спосіб додатково включає введення одного або декількох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається із протиблювотних засобів, антиспазматичних засобів, парасимпатолітичних засобів і агентів, які захищають слизову оболонку шлунка.

У шостому аспекті в даного винаходу пропонується спосіб лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, і одного або декількох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається із протиблювотних засобів, антиспазматичних засобів, парасимпатолітичних засобів і агентів, які захищають слизову оболонку шлунка.

40 У випадку якщо спосіб запропонований винаходом передбачає введення одного або декількох лікарських засобів, обраних із групи, яка складається із протиблювотних засобів, антиспазматичних засобів, парасимпатолітичних засобів і агентів, які захищають слизову оболонку шлунка, спосіб у різних варіантах здійснення передбачає введення: (i) протиблювотного засобу й антиспазматичного засобу; (ii) антиспазматичного засобу й агента, який захищає слизову оболонку шлунка; (iii) протиблювотного засобу й агента, який захищає слизову оболонку шлунка; або (iv) протиблювотного засобу, антиспазматичного засобу й агента, який захищає слизову оболонку шлунка.

В одному варіанті здійснення протиблювотний засіб вводять як протиблювотну профілактику до введення антитіла. В одному варіанті здійснення протиблювотний засіб вводять як протиблювотну інтервенцію одночасно й/або після введення антитіла. В одному варіанті здійснення протиблювотний засіб включає антагоніст рецептора 5-HT₃ і/або антагоніст рецептора нейрокініну 1 (NK1). Бажано, антагоніст рецептора NK1 включає апіпрітант (наприклад, еменд), і антагоніст рецептора 5-HT₃ включає ондансетрон (наприклад, зофран), гранісетрон (наприклад, кітрел, санкузо) або палонсетрон (наприклад, алокси), або комбінацію двох або більше із зазначених.

55 В одному варіанті здійснення антиспазматичні засоби включають бутилскополамін (бускопан).

В одному варіанті здійснення агент, який захищає слизову оболонку шлунка, включає агент, який зменшує вироблення шлункової кислоти. В одному варіанті здійснення агент, який захищає слизову оболонку шлунка, включає агент, обраний із групи, яка складається з інгібіторів протонного насоса, мізопростолу й омепразолу. В одному варіанті здійснення агент, який

захищає слизову оболонку шлунка, включає комбінацію інгібітору протонного насоса й мізопростолу. В одному варіанті здійснення інгібітор протонного насоса включає пантопразол (наприклад, пантозол).

В одному варіанті здійснення способу запропонований винаходом включає введення пацієнтові антагоніста рецептора NK1, такого як апрепітант (наприклад, еменд), антагоніста рецептора 5-HT₃, такого як ондансетрон (наприклад, зофран), гранісетрон (наприклад, кітрин, санкузо) або палонсетрон (наприклад, алокси), або комбінації двох або більше із них, антиспазматичного засобу, такого як бутилскополамін (наприклад, бускопан), та інгібітору протонного насоса, такого як пантопразол (наприклад, пантозол).

В одному варіанті здійснення способу за кожним із зазначених вище аспектів антитіло вводять шляхом внутрішньовенної (i.v.) інфузії. В одному варіанті здійснення внутрішньовенну інфузію проводять протягом періоду часу, що становить від 1 до 4 годин, бажано близько 2 годин.

У шостому аспекті в даному винаході пропонується спосіб визначення відповіді ракових пацієнтів на лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому зазначений спосіб передбачає стадію визначення рівня одного або декількох маркерів у крові в пацієнта, при цьому один або кілька маркерів обрані із групи, яка складається з CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IL-6, IFN γ і TNF α . У цьому аспекті до й після введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, а саме після введення одноразової дози антитіла, у пацієнта можуть бути взяті біологічні зразки, такі як кров, для встановлення рівня одного або декількох маркерів. З однієї й тієї ж тканини може бути взято багато зразків для визначення середніх рівнів і розрахунків можливих відхилень цих рівнів. Рівень одного або декількох маркерів після введення антитіла порівнюють із рівнем, визначеним до введення. Таким чином, ефект антитіла на пацієнта може бути встановлений за бажаною зміною рівня маркера після введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2. Якщо пацієнт демонструє бажану зміну рівня маркера після введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, то може бути ініційоване лікування антитілом, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2.

В одному варіанті здійснення рівень визначають у крові, плазмі або сироватці.

В одному варіанті здійснення один або кілька маркерів обрані із групи, яка складається з CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IFN γ і TNF α , і зниження рівня, щонайменше, одного з маркерів після введення антитіла вказує на те, що пацієнт відповідає на лікування або попередження ракового захворювання.

В одному варіанті здійснення маркером є IL-6, і підвищення рівня маркера після введення антитіла вказує на те, що пацієнт відповідає на лікування або попередження ракового захворювання.

У восьмому аспекті в даному винаході пропонується спосіб визначення сприйнятливості ракового пацієнта до лікування або попередження ракового захворювання, який передбачає введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, при цьому зазначений спосіб передбачає стадію визначення процентного вмісту CLDN18.2-позитивних ракових клітин.

У цьому варіанті здійснення перед введенням антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, у пацієнта може бути взятий біологічний зразок, такий як зразок пухлини (наприклад, біопсія пухлини), для встановлення рівня CLDN18.2-позитивних ракових клітин. Для визначення середнього рівня й для розрахунків можливих відхилень цих рівнів може бути відібрано багато зразків. У випадку якщо пацієнт має бажаний рівень CLDN18.2-позитивних ракових клітин, може бути введено антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2.

В одному варіанті здійснення рівень, що становить щонайменше 50 %, бажано 60 %, 70 %, 80 % або 90 %, щонайменше 95 % або щонайменше 98 % CLDN18.2-позитивних ракових клітин, вказує на те, що пацієнт є сприйнятливим до лікування або попередження ракового захворювання. В одному варіанті здійснення рівень, що становить щонайменше 40 %, бажано щонайменше 50 %, щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 % або щонайменше 90 % ракових клітин, які є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2, указує на те, що пацієнт є сприйнятливим до лікування або попередження ракового захворювання.

Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, може зв'язуватися з нативними епітопами CLDN18.2, присутніми на поверхні живих клітин. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN18.2. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, опосередковує знищення клітин за допомогою одного або декількох з наступних шляхів: лізису, опосередкованого залежною від комплексу цитотоксичністю (CDC), лізису, опосередкованого залежною від антитіл клітинною цитотоксичністю (ADCC), індукції апоптоза й

інгібування проліферації. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є моноклональним, химерним або гуманізованим антитілом, або фрагментом антитіла. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, обраним із групи, яка складається з (i) антитіла, продукованого й/або отриманого 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) антитіла, яке є химеризованою або гуманізованою формою антитіла згідно з (i); (iii) антитіла, яке має специфічність антитіла згідно з (i); і (iv) антитіла, яке містить ділянку, яка зв'язує антиген, або сайт, який зв'язує антиген, зокрема, варіабельну область, антитіла згідно з (i), яка бажано має специфічність антитіла згідно з (i). В одному варіанті здійснення антитіло зв'язується з терапевтичним агентом, таким як токсин, радіоізотоп, лікарський засіб або цитотоксичний агент.

В одному варіанті здійснення рак є CLDN18.2-позитивним. В одному варіанті здійснення клітини рака експресують CLDN18.2. В одному варіанті здійснення експресія CLDN18.2 відбувається на поверхні клітин. В одному варіанті здійснення щонайменше 50 %, бажано 60 %, 70 %, 80 % або 90 % ракових клітин є CLDN18.2-позитивними, і/або щонайменше 40 %, бажано, щонайменше 50 % ракових клітин є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2. В одному варіанті здійснення щонайменше 95 % або щонайменше 98 % ракових клітин є CLDN18.2-позитивними. В одному варіанті здійснення щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 % або щонайменше 90 % ракових клітин є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2.

В одному варіанті здійснення ракове захворювання обирають із групи, яка складається з раку шлунка, рака стравоходу, рака підшлункової залози, рака легенів, рака яєчника, рака товстої кишки, рака печінки, рака голови й шиї, рака жовчного міхура та їх метастазів. Ракове захворювання може бути пухлиною Крукенберга, перитонеальними метастазами й/або метастазами в лімфовузлах. В одному варіанті здійснення рак є аденокарциномою, зокрема, аденокарциномою пізньої стадії. В одному варіанті здійснення рак обирають із групи, яка складається з раку шлунка, рака стравоходу, зокрема, нижнього відділу стравоходу, рака стравохідно-шлункового переходу й гастроєзофагеального рака. В найкращому варіанті здійснення рак є гастроєзофагеальним раком, таким як метастатичний, рефракторний або рецидивуючий гастроєзофагеальний рак пізньої стадії. Пацієнт може бути Her2/neu-негативним пацієнтом або пацієнтом з Her2/neu-позитивним статусом, але таким, для якого терапія транструзумабом не є придатною. В одному варіанті здійснення пацієнт одержував раніше терапію, щонайменше, одним лікарським засобом, обраним із групи, яка складається з аналогів піримідину (наприклад, фторурацил і/або капецитабін), сполук платини (наприклад, цисплатин і/або оксалиплатин), епірубіцину, доцетакселу й детоксифікуючих агентів для протипухлинного лікування (наприклад, фолінат кальцію й/або фолієва кислота). В одному варіанті здійснення пацієнт має статус а шкалою ECOG, який становить від 0 до 1, і/або індекс Карновського від 70 до 100 %. В найкращому варіанті здійснення пацієнт є пацієнтом-людиною.

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

Даний винахід також забезпечує агенти, описані тут, такі як антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, для застосування в описаних тут способах.

Інші відмітні ознаки й переваги даного винаходу будуть очевидними з наведеного докладного опису й формули винаходу.

Короткий опис креслень

Фігура 1. Середня концентрація в крові IMAB362 під час дослідження.

Фігура 2. Активність ADCC мононуклеарних клітин периферійної крові (PBMC) пацієнтів. (A) PBMC виділяли зі зразків крові 6 пацієнтів через 7 днів (білий квадрат) або 14 днів (чорні квадрати) після введення IMAB362. Швидкості специфічного лізису клітин-мішеней рака шлунка NUGC-4, які експресують CLDN18.2, отримані після додавання 31,63 мкг/мл IMAB362 і PBMC від здорового донора або PBMC пацієнта (E:T=20:1), протягом 24 год. (B) Залежний від концентрації IMAB362 специфічний лізис клітин NUGC-4, отриманий через 24 год. після додавання PBMC різних пацієнтів (графіки показують середні значення \pm стандартне відхилення, величину p розраховували із застосуванням непарного t -критерію Стьюдента). (C) Криві ADCC-відповіді здорових контрольних PBMC при додаванні зростаючих концентрацій IMAB362. Аналізи виконували паралельно з кожним аналізом ADCC з PBMC пацієнтів. (D) Крива ADCC-відповіді PBMC пацієнтів при додаванні зростаючих концентрацій IMAB362 (для пацієнта 0202 недостатньо PBMC було отримано для побудови кривої). (E) Напівмаксимальні швидкості знищення для всіх пацієнтів і здорових донорів розраховували за допомогою програмного

забезпечення Graphpad Prism з використанням вбудованого інструмента аналізу нелінійної регресії.

Фігура 3. Здатність компонентів комплементу пацієнта індукувати IMAB 362-опосередковану CDC. Аналізи CDC виконували з CLDN18.2 і люцифераза-позитивними клітинами-мішенями CHO-K1. Клітини, сироватку (20 % об./об.) і антитіла інкубували протягом 80 хв. при 37 °C. Зразки від пацієнтів готували шляхом додавання свіжоприготовленого IMAB362 при концентрації 0,5 мкг/мл у зразки сироватки, узяті до інфузії (сірі стовпчики). HSC: Контрольний пул здорової людської сироватки з уведенням IMAB362 при концентрації 0,3-10 мкг/мл (позитивний контроль). Ні: Пул інактивованої шляхом нагрівання людської сироватки з уведенням IMAB362 при концентрації 10 мкг/мл (негативний контроль). Номера пацієнтів зазначені. Планка похибок: \pm стандартне відхилення.

Фігура 4. Здатність компонентів комплементу пацієнта взаємодіяти з уведенням внутрішньовенно (i.v.) IMAB362 у часі. Нормалізовані CDC-аналізи проводили шляхом доведення концентрації IMAB362 у кожному зразку до 0,5 мкг/мл з використанням узятій до інфузії сироватки кожного пацієнта (680-кратне розведення). (A/B) Аналізи CDC виконували, як описано для Фігури 3. (C) Кожна точка представляє значення для одного пацієнта. Білий квадрат: 0,5 мкг/мл IMAB362 у людській сироватці. Величини p одержували із застосуванням непарного t -критерію Стюдента. Планка похибок: середнє значення \pm стандартне відхилення.

Фігура 5. Кінетика цитотоксичності, індукованої введенням внутрішньовенно (i.v.) циркулюючим IMAB362. Клітини-мішені NUGC-4, PBMC одного здорового донора (E:T = 40:1) і зразки сироватки пацієнта (25 % об./об.) які використовували як антитіло й джерело комплементу в аналізі загальної цитотоксичності для визначення сумарної цитотоксичної активності. Зразки сироватки кожного пацієнта відбирали через 1, 7, 14 і 28-32 днів після введення IMAB362. Пацієнтам вводили зростаючі дози IMAB362 (33-1000 мг/м²). Концентрація антитіла, яке використовувалось в аналізі, зазначена під кожним стовпчиком. HSC: Пул людської сироватки з уведенням свіжоприготовленим IMAB362 при концентрації 200,0 мг/мл (EC₈₀₋₁₀₀). PSC: Контрольна сироватка пацієнта до інфузії з уведенням свіжоприготовленим IMAB362 при концентрації 200 мкг/мл. n.a.: дані відсутні.

Фігура 6. Кінетика ADCC-активності IMAB362 в інактивованій при нагріванні сироватці пацієнта. Аналіз проводили, як описано для попередньої фігури, за винятком того, що в цьому випадку комплемент пацієнта був інактивованій при нагріванні (56 °C, 30 хв.) для виділення ADCC-активності (чорні й сірі частини стовпчиків) і для розрахунків додаткових ефектів компонентів сироватки (білі частини стовпчиків).

Фігура 7. Активність CDC, індукована IMAB362, присутнім у сироватці пацієнта. Аналізи CDC виконували з CLDN18.2 і люцифераза-позитивними клітинами-мішенями CHO-K1. Їх інкубували протягом 80 хв. із 20 % (об./об.) сироватки пацієнта, отриманої через 1, 7, 14 і 28-32 дні після інфузії антитіла. Пацієнтам вводили IMAB362 при дозі від 33 до 1000 мг/м². Концентрація антитіла, яке використовувалось в кожному аналізі, зазначена під кожним стовпчиком. HSC: Контрольний пул здорової людської сироватки з уведеними спадаючими концентраціями IMAB362, як зазначено. PC: позитивний контроль (сироватка пацієнта до інфузії з уведенням IMAB362 при концентрації 10 мкг/мл).

Фігура 8: Результати фармакокінетичного дослідження багаторазових інфузій IMAB362 у пацієнтів. Середня \pm стандартне відхилення концентрація (мкг/мл) IMAB362 у сироватці 4 пацієнтів, яким вводили багаторазові дози, що становлять 300 мг/м² (когорта 1, ліва фігура) і до 30 пацієнтів (30 пацієнтів перша інфузія, 12 пацієнтів п'ята інфузія), яким вводили багаторазові дози, що становлять 600 мг/м² (когорта 2 і когорта 3 разом, права фігура). Стрілки показують інфузії IMAB362. Першу інфузію проводили в день 0.

Фігура 9. Виживання без прогресування захворювання пацієнтів у повній вибірці пацієнтів для аналізу (FAS).

Фігура 10. Виживання без прогресування захворювання пацієнтів у вибірці пацієнтів, які виконали вимоги протоколу (PP) (n=20).

Здійснення винаходу

Хоча даний винахід описаний докладно далі, слід розуміти, що даний винахід не обмежується конкретними методиками, протоколами й реагентами, описаними тут, оскільки вони можуть змінюватися. Також слід розуміти, що яка використовується тут термінологія необхідна тільки для опису конкретних варіантів здійснення винаходу й не повинна обмежувати обсяг даного винаходу, який буде визначений тільки прикладеною формулою винаходу. Якщо не визначено іншого, усі використовувані тут технічні й наукові терміни мають ті ж самі значення, які зазвичай надають їм фахівці в даній галузі.

Далі описані елементи даного винаходу. Дані елементи перераховані з певними варіантами

здійснення, однак слід розуміти, що вони можуть бути комбіновані будь-яким способом і в будь-якій кількості для створення додаткових варіантів здійснення. По-різному описані приклади й кращі варіанти здійснення не повинні розглядатися як такі, що обмежують даний винахід тільки конкретними описаними варіантами здійснення. Слід розуміти, що даний опис підтримує й охоплює варіанти здійснення, які поєднують конкретно описані варіанти здійснення з будь-якою кількістю розкритих і/або кращих елементів. Крім того, будь-які перестановки й комбінації всіх описаних елементів у даній заявці повинні вважатися розкритими описом даної заявки, якщо контекст не вказує інакшого.

Бажано, використаним тут термінам дають визначення, які описані в інструкції "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

Якщо не зазначено іншого, при здійсненні даного винаходу на практиці будуть використані загальноприйняті методи, які застосовуються в галузі хімії, біохімії, цитології, імунології й технології рекомбінантних ДНК, які описані в літературі в даній галузі (дивися, наприклад, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

У всьому даному описі й у наведеній нижче формулі винаходу, якщо контекст не припускає іншого, слово "включати" і варіанти, такі як "включає" і "який включає", необхідно розуміти як включення зазначеного елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, але не як виключення якого-небудь іншого елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій, хоча в деяких варіантах здійснення такий інший елемент, ціле число або стадія, або група елементів, цілих чисел або стадій можуть бути виключені, тобто об'єкт винаходу полягає у включенні зазначеного елемента, цілого числа або стадії, або групи елементів, цілих чисел або стадій. Терміни в однині (особливо в контексті формули винаходу) необхідно інтерпретувати, як такі, що охоплюють як однину, так і множину, якщо в даному документі не зазначено іншого або це явно не суперечить контексту. Перерахування діапазонів величин у даному описі використовується всього лише як спосіб скороченого перерахування всіх конкретних величин, які попадають у зазначений діапазон. Якщо в даному документі не зазначене іншого, кожна окрема величина включена в опис, так якби вона була окремо вказана в даному документі. Усі способи, описані тут, можуть бути виконані в будь-якій придатній послідовності, якщо в даному документі не зазначено іншого, або це явно не суперечить контексту. Використання будь-якого або всіх прикладів, або виразів, що вказують на приклади (наприклад, "такий як"), представлених тут, призначене тільки для кращого опису винаходу й не повинне обмежувати обсяг винаходу, якщо не вказано іншого. Ніякі вирази в описі не повинні розглядатися як такі, що вказують на який-небудь не зазначений у формулі винаходу елемент, суттєвий для здійснення винаходу на практиці.

Деякі документи процитовані по всьому тексту даного опису. Кожний з документів, процитованих тут (включаючи всі патенти, заявки на патенти, наукові публікації, специфікації виробника, інструкції тощо), або вище, або нижче, тим самим включений тут у всій повноті як посилання. Ніщо тут не повинне тлумачитися як допущення того, що винахід не має право передувати такому розкриттю виходячи з попереднього винаходу.

Термін "CLDN18" відноситься до клаудину-18 і включає будь-які варіанти, у тому числі сплайсований варіант 1 клаудина-18 (клаудин 18.1 (CLDN18.1)) і сплайсований варіант 2 клаудина-18 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)).

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

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

Термін "варіант" відповідно до винаходу відноситься, зокрема, до мутантів, сплайсованих варіантів, конформацій, ізоформ, алельних варіантів, видових варіантів і видових гомологів, зокрема таких, які існують у природі. Алельний варіант відноситься до зміни нормальної послідовності гена, значення якої часто залишається неясним. Повне секвенування гена часто виявляє численні алельні варіанти для заданого гена. Видовий гомолог є послідовністю нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності, які походять від виду, відмінного від того виду від якого взято вказану послідовність нуклеїнової кислоти або амінокислотної послідовності. Термін "варіант" охоплює будь-які посттрансляційно модифіковані варіанти й конформаційні варіанти.

Відповідно до винаходу термін "CLDN18.2-позитивний рак" означає рак, при якому ракові

клітини експресують CLDN18.2, бажано на поверхні зазначених ракових клітин.

Термін "клітинна поверхня" використовується відповідно до його звичайного значення в даній галузі й, таким чином, включає зовнішню поверхню клітини, яка доступна для зв'язування білками й іншими молекулами.

5 CLDN18.2 експресується на поверхні клітин, якщо він розташований на поверхні зазначених клітин і доступний для зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами, доданими до клітин.

Відповідно до винаходу CLDN18.2 не експресується в клітині в суттєвих кількостях, якщо рівень експресії є нижчим ніж експресується в клітинах шлунка або тканині шлунка. Бажано, рівень експресії становить менше ніж 10 %, бажано менше 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 10 0,05 % експресії в клітинах шлунка або тканині шлунка, або навіть нижче. Бажано, CLDN18.2 не експресується в клітині в суттєвих кількостях, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від тканини шлунка, більше ніж в 2 рази, бажано 1, 5 рази, і бажано не перевищує рівня експресії в зазначеній нераковій тканині. Бажано, CLDN18.2 не експресується в клітині в суттєвих кількостях, якщо рівень експресії є нижчим від межі 15 виявлення й/або якщо рівень експресії занадто низький для забезпечення зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами, доданими до клітин.

Відповідно до винаходу CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від шлунка, бажано більш ніж в 2 рази, бажано в 20 10 разів, 100 разів, 1000 разів або 10000 разів. Бажано, CLDN18.2 експресується в клітині, якщо рівень експресії вище межі виявлення й/або якщо рівень експресії є досить високим для забезпечення зв'язування CLDN18.2-специфічними антитілами, доданими до клітин. Бажано, CLDN18.2, експресується в клітині, експресується або розташовується на поверхні зазначеної клітини.

Відповідно до винаходу термін "захворювання" відноситься до будь-якого патологічного стану, включаючи рак, зокрема, тим формам рака, які описані в даному документі. Будь-яке посилання в даному документі на рак або конкретні форми раку також включає метастази раку. У кращому варіанті здійснення винаходу, захворювання, яке підлягає лікуванню відповідно до даної заявки, включає клітини, які експресують CLDN18.2.

"Захворювання, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2" або аналогічні вирази 30 відповідно до винаходу означають, що CLDN18.2 експресується в клітинах хворої тканини або органа. В одному варіанті здійснення експресія CLDN18.2 у клітинах хворої тканини або органа є підвищеною в порівнянні зі станом у здоровій тканині або органі. Під підвищенням розуміють збільшення щонайменше на 10 %, зокрема, щонайменше на 20 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 100 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 35 1000 %, щонайменше на 10000 % або навіть вище. В одному варіанті здійснення експресія виявляється тільки у хворій тканині, тоді як експресія в здоровій тканині є пригніченою. Відповідно до винаходу, захворювання, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN18.2, включають ракові захворювання. Крім того, відповідно до винаходу ракові захворювання переважно є такими захворюваннями, при яких ракові клітини експресують CLDN18.2.

Використаний тут термін "ракове захворювання" або "рак" включає захворювання, які 40 характеризується аномально регульованим клітинним ростом, проліферацією, диференціацією, адгезією й/або міграцією. Три злоякісні властивості раку (неконтрольований ріст (анормальний поділ), інвазія (проникнення й деструкція прилягаючих тканин) та іноді утворення метастазів (поширення в інші локалізації в тілі через лімфу або кров)) відрізняють рак від доброякісних пухлин, для яких характерне самокупірування та які не утворюють інвазій або метастаз. 45 Більшість видів раку формують пухлини, але деякі, такі як лейкоз, не формують. Під "раковою клітиною" розуміють аномальну клітину, яка росте шляхом швидкої неконтрольованої клітинної проліферації й продовжує рости після припинення дії стимулу, який ініціював ріст новоутворення. Переважно, "ракове захворювання" характеризується клітинами, які 50 експресують CLDN18.2, і ракова клітина експресує CLDN18.2. Клітина, яка експресує CLDN18.2, переважно є раковою клітиною, переважно описаних тут видів раку.

Відповідно до винаходу термін "пухлина" або "пухлинне захворювання" відноситься до аномального росту клітин (які називаються неопластичними клітинами, пухлиногенними клітинами або пухлинними клітинами), які переважно формують набрякання або ураження. Під 55 "пухлинною клітиною" розуміють аномальну клітину, яка росте шляхом швидкої неконтрольованої клітинної проліферації й продовжує рости після припинення дії стимулу, який ініціював ріст новоутворення. Пухлини демонструють часткову або повну відсутність структурної організації й функціональної взаємодії з нормальною тканиною й звичайно утворюють чітко виражену масу тканини, яка може бути доброякісною, передраковою або злоякісною.

60 Відповідно до винаходу пухлина переважно є злоякісною пухлиною. "Злоякісна пухлина"

використовується як синонім рака.

"Аденокарциномою" є рак, який виникає в залозистій тканині. Ця тканина також є частиною більшої категорії тканин, відомих як епітеліальні тканини. Епітеліальна тканина включає шкіру, залози й ряд інших тканин, які вистилають порожнини й органи тіла. Ембріологічно епітелій походить із ектодерми, ендодерми й мезодерми. Для того, щоб бути віднесеними до аденокарциноми клітини необов'язково повинні бути частиною залози, оскільки вони мають секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати в деяких вищих ссавців, включаючи людей. На відміну від слабо диференційованої, добре диференційована аденокарцинома нагадує залозисту тканину, з якої вона походить. Шляхом фарбування клітин, отриманих шляхом біопсії, патолог визначає, чи є пухлина аденокарциномою або яким-небудь іншим типом рака. Аденокарцинома може виникати в багатьох тканинах тіла внаслідок убиквітарної природи залоз в організмі. Незважаючи на те, що кожна залоза може не виділяти ту саму речовину, оскільки існує екзокринна функція клітини, вона вважається залозистою та її злоякісна форма, таким чином, називається аденокарциномою. Злоякісні аденокарциноми інвазують багато тканин і часто утворюють метастази за умови наявності для цього достатнього часу. Аденокарцинома яєчника є найпоширенішим типом карциноми яєчника. Вона включає серозну й муцинозну аденокарциноми, світлоклітинну аденокарциному й ендометриїдну аденокарциному.

Під "утворенням метастаз" розуміють поширення ракових клітин з вихідної ділянки в іншу частину тіла. Утворення метастаз є дуже складним процесом, який залежить від відриву злоякісних клітин від первинної пухлини, інвазії позаклітинного матрикса, проникності ендотеліальних базальних мембран для проникнення в порожнину тіла й судин, і потім, після перенесення кров'ю, інфільтрації в органи-мішені. В остаточному підсумку, ріст нової пухлини в ділянці-мішені залежить від ангиогенеза. Утворення метастаз пухлини часто відбувається навіть після видалення первинної пухлини, тому що пухлинні клітини або компоненти можуть залишатися й проявляти метастатичний потенціал. В одному варіанті здійснення термін "утворення метастаз" відповідно до винаходу відноситься до "віддаленого утворення метастаз", яке має відношення до утворення метастаз, яке відбувається в ділянках, віддалених від первинної пухлини й системи регіональних лімфатичних вузлів. В одному варіанті здійснення термін "утворення метастаз" відповідно до винаходу відноситься до метастаз у лімфовузлах. Однієї конкретною формою метастаз, яка піддається лікуванню з використанням терапії запропонованої винаходу, є метастази, які походять з раку шлунка як первинної ділянки. У кращих варіантах здійснення такі метастази рака шлунка називаються пухлинами Крукенберга, перитонеальними метастазами й/або метастазами в лімфовузлах.

Пухлина Крукенберга є метастатичною пухлиною яєчника, яка рідко зустрічається, частка якої складає від 1 % до 2 % усіх пухлин яєчника. Прогноз пухлини Крукенберга усе ще дуже непевний, і схвалена терапія для пухлин Крукенберга відсутня. Пухлина Крукенберга є метастатичною перстневидноклітинною аденокарциномою яєчника. Шлунок є первинною ділянкою в більшості випадків пухлини Крукенберга (70 %). Карцинома товстої кишки, апендициту й молочної залози (в основному інвазивна лобулярна карцинома) є наступним найпоширенішими первинними вогнищами. Повідомлялося про рідкісні випадки пухлини Крукенберга, джерелом походження якої є карцинома жовчного міхура, жовчних протоків, підшлункової залози, тонкого кишечника, фатерова соска, шийки матки й сечового міхура/сечової протоки.

Жінки з пухлиною Крукенберга, як правило, є у край молодими для пацієнтів з метастатичною карциномою, зазвичай вони мають вік після 40 років, у середньому, вік 45 років. Цей молодий вік поширення може бути почасти пов'язаний зі збільшеною частотою випадків перстневидноклітинних аденокарцином у молодих жінок. Загальні симптоми, що проявляються, звичайно стосуються яєчника, найбільш загальними з яких є біль у животі й здуття живота (головним чином через звичайно білатеральні й часто більші маси яєчника). Інші пацієнти мають неспецифічні шлунково-кишкові симптоми або є бессимптомними. Крім того, пухлина Крукенберга за наявним даними пов'язана з вірилізацією, яка виникає в результаті вироблення гормонів стромою яєчника. Асцит присутній в 50 % випадків і звичайно виявляє злоякісні клітини.

Пухлини Крукенберга є білатеральними в більше ніж 80 % відомих випадків. Яєчники звичайно асиметрично збільшені з горбистим контуром. Розсічені поверхні жовті або білі; вони звичайно тверді, хоча іноді кістозні. Важливо, що капсулярна поверхня яєчників з пухлинами Крукенберга звичайно є гладенькою й не має спайок або перитонеальних відкладень. Слід зазначити, що інші метастатичні пухлини яєчника мають тенденцію бути пов'язаними з поверхневими імплантатами. Це може пояснювати, чому макроскопічна морфологія пухлини

Крукенберга може хибно визначатися як первинна пухлина яєчника. Однак білатеризм пухлини Крукенберга узгоджується з її метастатичною природою.

Пацієнти з пухлинами Крукенберга мають загальний показник смертності, який є значно високим. Більшість пацієнтів помирає протягом 2 років (середнє виживання 14 місяців). Деякі дослідження показують, що прогноз є непевним, коли первинна пухлина ідентифікована після того, як виявлені метастази в яєчник, і прогноз стає ще гіршим, якщо первинна пухлина залишається прихованою.

Під терміном "лікувати" розуміють введення сполуки або композиції, або комбінації сполук або композицій суб'єктові для попередження або усунення захворювання, включаючи зменшення розміру пухлини або ряду пухлин у суб'єкта; купірування або уповільнення виникнення захворювання в суб'єкта; інгібування або уповільнення розвитку нового захворювання в суб'єкта; зменшення частоти або тяжкості симптомів і/або повторних проявів у суб'єкта, який на даний момент має, або який раніше мав захворювання; і/або продовження, тобто збільшення тривалості життя суб'єкта.

Зокрема, термін "лікування захворювання" включає видужування, скорочення тривалості, зменшення інтенсивності, попередження, уповільнення або пригнічення прогресування або погіршення, або попередження й відтермінування початку розвитку захворювання або його симптомів.

Термін "пацієнт" означає відповідно до винаходу суб'єкта, що підлягає лікуванню, зокрема суб'єкта, який має захворювання, у тому числі людину, приматів крім людини або інших тварин, зокрема ссавців, таких як корови, коні, свині, вівці, кози, собаки, кішки або гризуни, такі як миші й пацюки. В найкращому варіанті здійснення пацієнтом є людина.

Відповідно до винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, можна вводити в комбінації, тобто одночасно, послідовно й/або після агента, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2.

Вираз "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" відноситься до агента або комбінації агентів, надходження яких до клітини призводить до підвищеної експресії CLDN18.2 на рівні РНК і/або білка, бажано підвищеної експресії білка CLDN18.2 на клітинній поверхні, у порівнянні із ситуацією, коли клітини не забезпечені агентом або комбінацією агентів. Переважно, клітина є раковою клітиною, зокрема, раковою клітиною, яка експресує CLDN18.2, такою як клітина описаних тут типів рака. Вираз "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" відноситься, зокрема, до агента або комбінації агентів, надходження яких до клітини приводить до більш високої щільності CLDN18.2 на поверхні зазначених клітин у порівнянні із ситуацією, коли клітини не забезпечені агентом або комбінацією агентів. "Стабілізація експресії CLDN18.2" включає, зокрема, ситуацію, коли агент або комбінація агентів запобігає зниженню або зменшує зниження експресії CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 буде знижуватися без надходження агента або комбінації агентів, і надходження агента або комбінації агентів запобігає зазначеному зниженню або зменшує зазначене зниження експресії CLDN18.2. "Підвищення експресії CLDN18.2" включає, зокрема, ситуацію, коли агент або комбінація агентів підвищує експресію CLDN18.2, наприклад, експресія CLDN18.2 буде знижуватися, залишатися в основному постійною або підвищуватися без надходження агента або комбінації агентів, і надходження агента й комбінації агентів підвищує експресію CLDN18.2 у порівнянні із ситуацією без надходження агента або комбінації агентів, таким чином, отримана в результаті експресія є більш високою в порівнянні із ситуацією, коли експресія CLDN18.2 буде знижуватися, залишатися в основному постійною або підвищуватися без надходження агента або комбінації агентів.

Відповідно до винаходу вираз "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" включає хіміотерапевтичні агенти або комбінації хіміотерапевтичних агентів, таких як цитостатичні агенти. Хіміотерапевтичні агенти можуть впливати на клітини одним з наступних способів: (1) пошкоджувати ДНК клітин таким чином, що вони не можуть більше репродукуватися; (2) інгібувати синтез нових ниток ДНК таким чином, що реплікація клітин стає неможливою; (3) зупиняти мітотичні процеси клітин таким чином, що клітини не можуть ділитися на дві клітини.

Відповідно до винаходу вираз "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" бажано відноситься до агента або комбінації агентів, таких як цитостатична сполука або комбінація цитостатичних сполук, надходження яких у клітини, зокрема ракові клітини, приводить до одержання клітин, які блоковані або накопичуються в одній або декількох фазах клітинного циклу, бажано в одній або декількох фазах клітинного циклу, відмінних від фаз G1 і G0, бажано відмінних від фази G1, бажано в одній або декількох з фаз G2 або S клітинного циклу, таких як G1/G2-, S/G2-, G2- або S-Фаза клітинного циклу. Вираз "клітини, які блоковані

або накопичуються в одній або декількох фазах клітинного циклу" означає, що процентний вміст клітин, які перебувають у зазначеній одній або декількох фазах клітинного циклу, збільшується. Кожна клітина для самореплікації проходить через цикл, що включає чотири фази. У першій фазі, яка має назву G1, клітина готується до реплікації своїх хромосом. Друга стадія називається S, і в цій фазі відбувається синтез ДНК і відбувається дуплікація ДНК. Наступна фаза називається фазою G2, коли відбувається дуплікація РНК і білка. Кінцевою стадією є стадія М, яка є стадією фактичного клітинного поділу. У цій кінцевій стадії дупліковані ДНК і РНК розщеплюються й розходяться до різних кінців клітини, і клітина фактично ділиться на дві ідентичні функціональні клітини. Хіміотерапевтичні агенти, які є агентами, що пошкоджують ДНК, звичайно призводять до нагромадження клітин в G1- і/або G2-фазі. Хіміотерапевтичні агенти, які блокують клітинний ріст шляхом перешкоджання синтезу ДНК, такі як антиметаболіти, звичайно призводять до нагромадження клітин в S-фазі. Прикладами цих лікарських засобів є 6-меркаптопурин і 5-фторурацил.

Відповідно до винаходу вираз "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" включає антрацикліни, такі як епірубіцин, сполуки платини, такі як оксаплатин і цисплатин, нуклеозидні аналоги, такі як 5-фторурацил, або їх проліки, таксани, такі як доцетаксел, і аналоги камптотечину, такі як іринотекан і топотекан, а також комбінації лікарських засобів, наприклад, комбінації лікарських засобів, що включають один або декілька антрациклінів, таких як епірубіцин, оксаліплатин і 5-фторурацил, наприклад, комбінацію лікарських засобів, що включає оксаліплатин і 5-фторурацил, або інші комбінації лікарських засобів, описані тут.

В одному кращому варіанті здійснення "агент, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2" є "агентом, який індукуює імунітет до загибелі клітин".

У специфічних випадках ракові клітини можуть вступати на шлях летального стресу, пов'язаний з випусканням комбінації сигналів, визначених у просторі й у часі, який декодований імунною системою на активацією пухлино-специфічних імунних відповідей (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798-804). У такому сценарії ракові клітини починають випускати сигнали, які сприймаються ефektорами вродженого імунітету, такими як дендритні клітини, які викликають когнатну імунну відповідь, у яку залучені CD8+T-клітини й передачу сигналу IFN-γ, таким чином, що загибель ракових клітин може викликати сприятливу протипухлинну імунну відповідь. Ці сигнали включають преапоптотичну експозицію кальретикуліну (CRT), шаперону ендоплазматичного ретикулюму (ER), на поверхні клітини, преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1. Узяті разом, ці процеси складають молекулярні детермінанти імунітету до загибелі клітин (ICD). Антрацикліни, оксаліплатин і гамма-опромінення здатні індукувати усі сигнали, які визначають ICD, тоді як, наприклад, цисплатин, який позбавлений здатності індукувати транслокацію CRT з ER на поверхню клітин, що гинуть, – процесу, який вимагає стресу ER – вимагає доповнення тапсигаргіном, індуктором ER стресу.

Відповідно до винаходу вираз "агент, який індукуює імунітет до загибелі клітин" відноситься до агента або комбінації агентів, які у випадку надходження в клітини, зокрема ракові клітини, здатні індукувати вступ клітин на шлях летального стресу, який в остаточному підсумку викликає пухлино-специфічні імунні відповіді. Зокрема, агент, який індукуює імунітет до загибелі клітин, при надходженні в клітини індукуює випуск клітинами визначеної в просторі й у часі комбінації сигналів, включаючи, зокрема, преапоптотичну експозицію кальретикуліну (CRT), шаперона ендоплазматичного ретикулюму (ER), на клітинній поверхні, преапоптотичну секрецію АТФ і постапоптотичне вивільнення ядерного білка HMGB1.

Відповідно до даного винаходу вираз "агент, який індукуює імунітет до загибелі клітин" включає антрацикліни й оксаліплатин.

Антрацикліни є класом лікарських засобів, які широко застосовуються в хіміотерапії раку, які до того ж є антибіотиками. За структурою всі антрацикліни мають загальну структуру 7,8,9,10-тетрагідротетрацен-5,12-хінону, який складається із чотирьох кілець, і звичайно вимагають глікозилування в певних ділянках.

Антрацикліни бажано діють за допомогою приблизно одного або декількох з наступних механізмів:

1. інгібування синтезу ДНК і РНК шляхом інтеркаляції між парами основ нитки ДНК/РНК, запобігаючи, таким чином, реплікації швидко зростаючих ракових клітин;

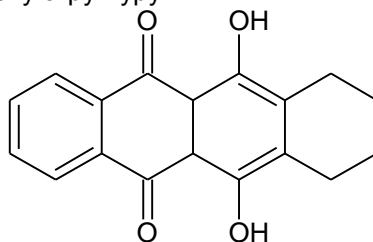
2. інгібування ферменту топоізомерази II, запобігаючи, таким чином, релаксації суперспіральної ДНК і, таким чином, блокуючи транскрипцію й реплікацію ДНК;

3. створення опосередкованих залізом вільних радикалів кисню, які пошкоджують ДНК і клітинні мембрани.

Відповідно до винаходу термін "антрациклін" бажано відноситься до агента, бажано

протипухлинного агента, призначеного для індукції апоптоза, бажано шляхом інгібування повторного лігування ДНК топоізомеразою II.

Бажано, відповідно до винаходу термін "антрациклін", як правило, відноситься до класу сполук, які мають наступну кільцеву структуру:



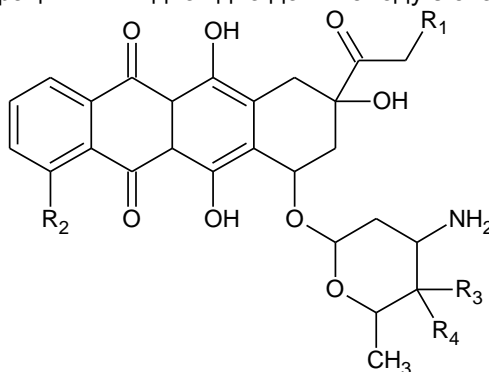
5

включаючи їх аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, складні ефіри, кон'югати й проліки.

Приклади антрациклінів і аналогів антрациклінів включають, але не обмежуються, даунорубіцин (дауноміцин), доксорубіцин (адриаміцин), епірубіцин, ідарубіцин, родоміцин, пірарубіцин, валрубіцин, N-трифтор-ацетил доксорубіцин-14-валерат, аклациноміцин, морфолінодоксорубіцин (морфоліно-DOX), ціаноморфоліно-доксорубіцин (ціаноморфоліно-DOX, 2-піроліно-доксорубіцин (2-PDOX), 5-імінодаунорубіцин, мітоксантрон і аклациноміцин А (акларубіцин). Мітоксантрон є членом класу антрацендіонових сполук, що є аналогами антрациклінів, які позбавлені цукрової ланки антрациклінів, але зберігають планарну поліциклічну ароматичну кільцеву структуру, яка забезпечує інтеркаляцію в ДНК.

15

Найбільш бажаною з антрациклінів відповідно до винаходу є сполука наступної формули:



у якій:

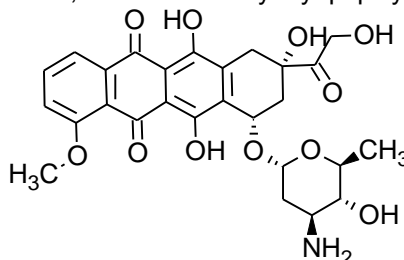
R₁ обраний із групи, яка складається з Н і ОН, R₂ обраний із групи, яка складається з Н і ОМе, R₃ обраний із групи, яка складається з Н і ОН, і R₄ обраний із групи, яка складається з Н і ОН.

20

В одному варіанті здійснення R₁ є Н, R₂ є ОМе, R₃ є Н і R₄ є ОН. В іншому варіанті здійснення R₁ є ОН, R₂ є ОМе, R₃ є Н, і R₄ є ОН. В іншому варіанті здійснення R₁ є ОН, R₂ є ОМе, R₃ є ОН і R₄ є Н. В іншому варіанті здійснення R₁ є Н, R₂ є Н, R₃ є Н і R₄ є ОН.

25

Як антрациклін в контексті даного винаходу зокрема розглядається епірубіцин. Епірубіцин є антрацикліновим лікарським засобом, який має наступну формулу:



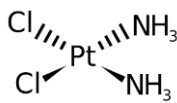
30

і випускається під торговельною назвою 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-діону. У деяких режимах хіміотерапії епірубіцин є більш бажаним ніж доксорубіцин, найбільш популярний антрациклін, оскільки, як виявилось, викликає менше побічних ефектів.

Відповідно до винаходу термін "сполуки платини" відноситься до сполук, які містять у своїй

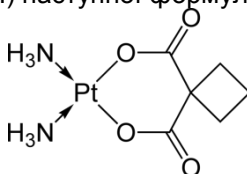
структурі платину, зокрема у вигляді комплексів платини і включає сполуки, такі як цисплатин, карбоплатин і оксаліплатин.

Термін "цисплатин" або "двовалентна платина" відноситься до сполуки цис-діаміндихлороплатини(II) (CDDP) наступної формули:



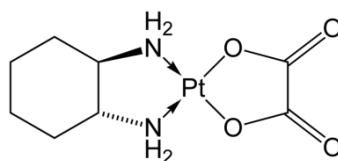
5

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



10

Термін "оксаліплатин" відноситься до сполуки, яка є сполукою платини, яка утворює комплекс із лігандом носія на основі діаміноциклогексану наступної формули:



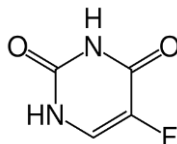
Зокрема, термін "оксаліплатин" відноситься до сполуки [(1R, 2R)-циклогексан-1,2-діамін](етандіоато-О, О')платина(II). Оксаліплатин, призначений для ін'єкції, також випускається під торговельною назвою Eloxatine (елоксатин).

15

Термін "нуклеозидний аналог" відноситься до структурного аналога нуклеозида, категорії, яка включає аналоги пурину й аналоги піримідину. Зокрема, термін "нуклеозидний аналог" відноситься до фторпіримідинових похідних, які включають фторурацил та його проліки.

20

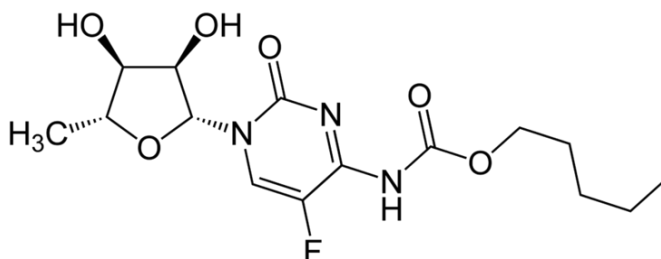
Термін "фторурацил" або "5-фторурацил" (5-FU або f5U) (присутні на ринку під торговельними назвами Adrucil (адруцил), Carac (карак), Efudix (Ефудикс), Efudex (ефудекс) і Fluoroplex (фтороплекс) позначає сполуку, яка є аналогом піримідину наступної формули:



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

25

Термін "капецитабін" (Xeloda, Roche) відноситься до хімотерапевтичного агента, який є проліками, які перетворюються на 5-FU у тканинах. Капецитабін, який може бути введений перорально, має наступну формулу:



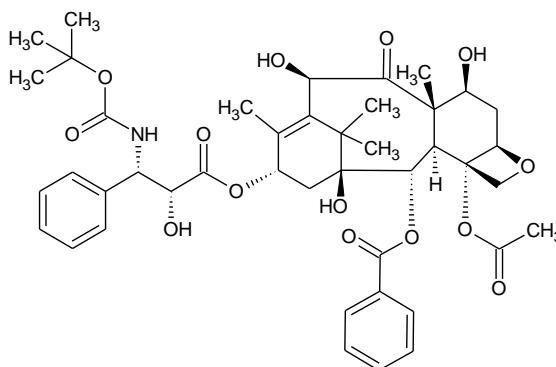
30

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

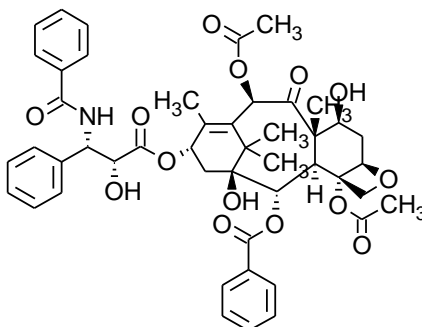
Таксани є класом дитерпенових сполук, які спочатку були виділені із природних джерел, таких як рослини роду Тис (Taxus), але деякі з них були синтезовані штучно. Основним механізмом дії лікарських засобів класу таксанів є порушення функції мікротрубочок, яке інгібує, таким чином, процес поділу клітин. Таксани включають доцетаксел (таксотер) і паклітаксел (таксол).

Відповідно до винаходу термін "доцетаксел" відноситься до сполуки, яка має наступну

формулу:

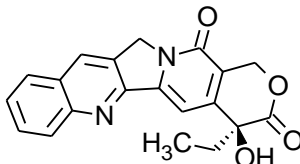


Відповідно до винаходу термін "паклітаксел" відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:



5

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

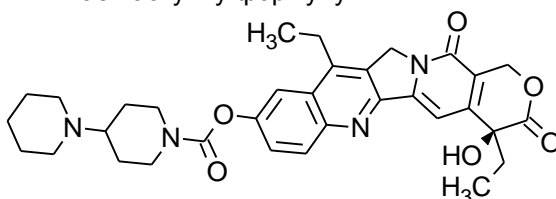


10

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

Іринотекан є лікарським засобом, який запобігає розкручуванню ДНК шляхом інгібування топоізомерази I. У хімічних термінах іринотекан є напівсинтетичним аналогом природного алкалоїду камптотецину, який має наступну формулу:

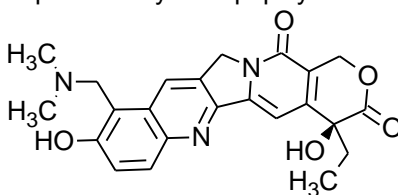
15



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,бїпіперидин]-1'-карбоксилату.

20

Топотекан є інгібітор топоізомерази наступної 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)-діону моногідрохлориду.

Відповідно до винаходу, агентом, який стабілізує або підвищує експресію CLDN18.2, може бути хіміотерапевтичний агент, зокрема, хіміотерапевтичний агент, схвалений для терапії раку, і може бути частиною комбінації лікарських засобів, такою як комбінація лікарських засобів, схвалена для застосування в терапії раку. Така комбінація лікарських засобів може бути комбінацією лікарських засобів, яка застосовується в хіміотерапії, і може бути комбінацією лікарських засобів, які застосовуються в хіміотерапевтичному режимі, обраному із групи, яка складається з хіміотерапії EOX, хіміотерапії ECF, хіміотерапії ECX, хіміотерапії EOF, хіміотерапії FLO, хіміотерапії FOLFOX, хіміотерапії FOLFIRI, хіміотерапії DCF і хіміотерапії FLOT.

Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії EOX, включає епірубіцин, оксаліплатин і капецитабін. Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії ECF, включає епірубіцин, цисплатин і 5-фторурацил. Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії ECX, включає епірубіцин, цисплатин і капецитабін. Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії EOF, включає епірубіцин, оксаліплатин і 5-фторурацил.

Епірубіцин звичайно вводять у дозі 50 мг/м², цисплатин 60 мг/м², оксаліплатин 130 мг/м², тривалу венозну інфузію 5-фторурацилу проводять у дозі 200 мг/м²/день і пероральне введення капецитабіну в дозі 625 мг/м² 2 рази на день усього протягом восьми 3-тижневих циклів.

Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії FLO, включає 5-фторурацил, фолієву кислоту й оксаліплатин (звичайно 24-годинна інфузія 5-фторурацилу в дозі 2600 мг/м², фолієва кислота в дозі 200 мг/м² і оксаліплатин у дозі 85 мг/м² кожні 2 тижні).

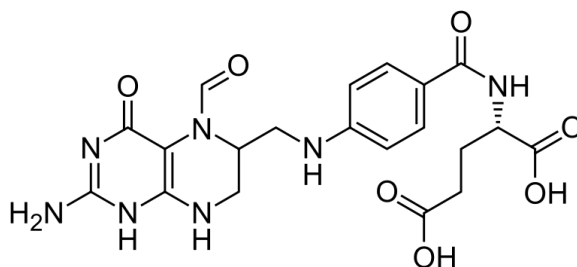
FOLFOX є режимом хіміотерапії, який включає фолієву кислоту (лейковорин), 5-фторурацил й оксаліплатину. Рекомендований терапевтичний вплив проводять кожні два тижні в такий спосіб: День 1: оксаліплатин у дозі 85 мг/м² шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії й лейковорин у дозі 200 мг/м² шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії з наступним 5-FU у дозі 400 мг/м² шляхом внутрішньовенного (IV) болюсного введення, з наступним 5-FU у дозі 600 мг/м² шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії у вигляді 22-годинної безперервної інфузії; День 2: лейковорин у дозі 200 мг/м² шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії протягом 120 хвилин з наступним 5-FU у дозі 400 мг/м² шляхом внутрішньовенного (IV) болюсного введення, проведеного протягом 2-4 хвилин, з наступним 5-FU у дозі 600 мг/м² шляхом внутрішньовенної (IV) інфузії у вигляді 22-годинної безперервної інфузії.

Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії FOLFIRI, включає 5-фторурацил, лейковорин і іринотекан.

Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії DCF, включає доцетаксел, цисплатин і фторурацил.

Комбінація лікарських засобів, яка використовується в хіміотерапії FLOT, включає доцетаксел, оксаліплатин, 5-фторурацил і фолієву кислоту.

Термін "фолієва кислота" або "лейковорин" відноситься до сполуки, яка використовується в синергічній комбінації з хіміотерапевтичним агентом 5-фторурацилом. Фолієва кислота має наступну формулу:



Зокрема, 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}пентандіова кислота.

Відповідно до винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, можна вводити в комбінації, тобто одночасно, послідовно й/або після агента, який стимулює γδ-Т-клітини.

γδ-Т-клітини (гамма-дельта Т-клітини) представляють невелику субпопуляцію Т-клітин, які мають на своїй поверхні видозмінений Т-клітинний рецептор (TCR). Більшість Т-клітин несе Т-клітинний рецептор (TCR), що складається із двох глікопротеїнових ланцюгів, які називаються α- і β-TCR-ланцюгами. Напроти, в γδ-Т-клітинах Т-клітинний рецептор (TCR) складається з одного γ-ланцюга й одного δ-ланцюга. Як правило, ця група Т-клітин є набагато менш поширеною, ніж αβ-Т-клітини. Людські γδ-Т-клітини відіграють важливу роль у реакціях, які контролюють стрес, такий як інфекційні захворювання й аутоімунітет. Передбачається, що індуковані

трансформацією зміни в пухлинах також викликають реакції, які контролюють стрес, і опосередковані $\gamma\delta$ -Т-клітинами, та підсилюють протипухлинний імунітет. Важливо, що після захоплення антигену активовані $\gamma\delta$ -Т-клітини в ділянках ураження забезпечують цитокини (наприклад, $INF\gamma$, $TNF\alpha$) і/або хемокини, які опосередковують рекрутинг інших ефекторних клітин, і демонструють негайні ефекторні функції, такі як цитотоксичність (за допомогою шляху "смерті рецептора" і цитолітичних гранул) і ADCC.

Більшість $\gamma\delta$ -Т-клітин у периферійній крові експресують $V\gamma 9V\delta 2$ -Т-клітинний рецептор (TCR $\gamma\delta$). $V\gamma 9V\delta 2$ -Т-клітини є унікальними для людини й приматів і, як вважається, відіграють важливу роль у ранньому сприйнятті "небезпеки" інвазивними агентами, тому що вони інтенсивно розмножуються при багатьох гострих інфекціях і їх за кілька днів може бути більше всіх інших лімфоцитів, наприклад, у туберкульозі, сальмонельозі, ерліхіозі, бруцельозі, туляремії, лістеріозі, токсоплазмозі та малярії.

$\gamma\delta$ -Т-клітини відповідають на малі непептидні фосфорильовані антигени (фосфоантигени), такі як пірофосфати, синтезовані в бактеріях, та ізопентенілпірофосфат (IPP), який продукується у клітинах ссавців за допомогою мевалонатного шляху. Тоді як продукування IPP у нормальних клітинах є недостатнім для активації $\gamma\delta$ -Т-клітин, дисрегуляція мевалонатного шляху в клітинах пухлини призводить до накопичення IPP і активації $\gamma\delta$ -Т-клітин. Також, IPP може бути терапевтично збільшеним амінобіфосфонатами, які інгібують фермент фарнезил-пірофосфат-синтазу мевалонатного шляху (FPPS). Серед інших, золедронова кислота (ZA, золендронат, ZometaTM, Novartis) представляє такий амінобіфосфонат, який уже вводили клінічно пацієнтам для лікування остеопорозу й метастатичного захворювання костей. При обробці PBMC *in vitro* золедронова кислота (ZA) поглинається в основному моноцитами. Ізопентенілпірофосфат (IPP) накопичується в моноцитах, які диференціюють в антигенпредставляючі клітини, стимулюючи розвиток $\gamma\delta$ -Т-клітин. У даному контексті додавання як фактора росту інтерлейкіну-2 (IL-2) є кращим для виживання активованих $\gamma\delta$ -Т-клітин. На закінчення, було описано, що деякі алкільовані аміни активують $V\gamma 9V\delta 2$ -Т-клітини *in vitro*, однак тільки в мілімолярних концентраціях.

Відповідно до винаходу вираз "агент, який стимулює $\gamma\delta$ -Т-клітини" відноситься до сполук, які стимулюють розвиток $\gamma\delta$ -Т-клітин, зокрема $V\gamma 9V\delta 2$ -Т-клітин, *in vitro* і/або *in vivo*, особливо шляхом індукції активації й розмноження $\gamma\delta$ -Т-клітин. Переважно, вираз відноситься до сполук, які *in vitro* і/або *in vivo* підвищують ізопентенілпірофосфат (IPP), який продукується у клітинах ссавця, бажано шляхом інгібування ферменту фарнезил-пірофосфат-синтази (FPPS) мевалонатного шляху.

Однією з конкретних груп сполук, які стимулюють $\gamma\delta$ -Т-клітини, є біфосфонати, зокрема, зотовмісні біфосфонати (N-біфосфонати; амінобіфосфонати).

Наприклад, біфосфонати, придатні для застосування в даному винаході, можуть включати одну або декілька з наступних сполук, включаючи їх аналоги й похідні, фармацевтичні солі, гідрати, складні ефіри, кон'югати й проліки:

[1-гідрокси-2-(1H-імідазол-1-іл)етан-1,1-диіл]біс(фосфонова кислота), золедронова кислота, наприклад, золендронат;

(дихлор-фосфоно-метил)фосфонова кислота, наприклад, клодронат;

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

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

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

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

[3-(диметиламіно)-1-гідроксипропан-1,1-диіл]біс(фосфонова кислота), олпадронова кислота.

[4-аміно-1-гідрокси-1-(гідрокси-оксидо-фосфорил)-бутил]фосфонова кислота, аледронова кислота, наприклад, алендронат;

[(циклогептиламіно)метилен]біс(фосфонова кислота), інкадронова кислота;

(1-гідроксиетан-1,1-диіл)біс(фосфонова кислота), етидронова кислота, наприклад, етидронат; і

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

Відповідно до винаходу золедронова кислота (INN) або золендронат (під торговельною назвою Novartis торговельних марок Зомета (Zometa), Зомера (Zomera), Акласта (Aclasta) і Рекласт (Reclast)) є найкращим біфосфонатом. Зомета застосовують для попередження

переломів кісток у пацієнтів з раком, таким як множинна мієлома й рак передміхурової залози. А також для лікування остеопорозу. Крім того, він може застосовуватися для лікування пухлино-асоційованої гіперкальцемії й бути корисним для лікування болю, викликаного метастазами в кісті.

В одному з кращих варіантів здійснення агент, який стимулює $\gamma\delta$ -Т-клітини відповідно до винаходу, уводять у комбінації з IL-2. Така комбінація виявилася особливо ефективною в опосередкуванні розмноження й активації $\gamma\delta$ -Т-клітин.

Інтерлейкін-2(IL-2) є інтерлейкіном, типом сигнальної молекули цитокіну в імунній системі. Це білок, який залучає лімфоцити і є частиною природньої відповіді організму на мікробну інфекцію, і здатний розпізнавати чужорідні (не свої) мішені. IL-2 опосередковує свої ефекти шляхом зв'язування з IL-2-рецепторами, які експресуються лімфоцитами.

IL-2, який використовується відповідно до винаходу, може бути будь-яким IL-2, що підтримує або забезпечує можливість стимуляції $\gamma\delta$ -Т-клітин, і може бути отриманий від будь-яких видів, бажано людини. IL-2 може бути ізольованим, отриманим рекомбінантно або синтетично IL-2, і може мати природнє походження або бути модифікованим IL-2.

Відповідно до винаходу, термін "протиблювотний засіб" відноситься до сполуки, композиції або лікарського засобу, які є ефективними проти блювоти й/або нудоти. В одному варіанті здійснення протиблювотний засіб включає антагоніст рецептора 5-HT₃ і/або антагоніст рецептора нейрокиніну 1 (NK1).

Антагоністи рецептора 5-HT₃ блокують серотонінові рецептори в центральній нервовій системі й шлунково-кишковому тракті. Їхні приклади включають, але не обмежуються: ондансетрон (зофран), який можна вводити перорально у формі таблетки, перорально у формі таблетки, що розчиняється, або шляхом ін'єкції; доласетрон (анземет), який можна вводити у формі таблетки або шляхом ін'єкції; гранісетрон (кітрил, санкузо), який можна вводити у формі таблетки (кітрил), перорального розчину (кітрил), ін'єкції (кітрил) або у формі одноразового трансдермального пластиру на плече (санкузо); тропісетрон (навобан), який можна вводити у формі пероральних капсул або ін'єкції; палоносетрон (алокси), який можна вводити у формі ін'єкції або пероральних капсул; і міртазапін (ремерон).

Антагоністи рецептора NK1 включають, але не обмежуються, апрепітант (еменд).

Кращою комбінацією антагоніста рецептора 5-HT₃ і антагоніста рецептора NK1 є комбінація ондансетрона (зофран) і апрепітанта (еменд).

Додаткові протиблювотні засоби, які можуть бути використані відповідно до винаходу, особливо в комбінації з антагоністом рецептора 5-HT₃ і/або антагоністом рецептора NK1, включають, але не обмежуються, метоклопрамід (реглан), який діє на GI тракт як прокінетичний засіб, лоразепам, атропін, алізаприд (літікан, плітікан, суперан, вергентан) і дименгідринат (драмамін, дрімінат, гравол, гравамін, вомекс, вертирозан).

Відповідно до винаходу можна вводити антиспазматичний засіб (синонім: спазмолітичний засіб). Відповідно до винаходу термін "антиспазматичний засіб" відноситься до сполуки, композиції або лікарського засобу, яка пригнічує м'язові спазми. Бажано, антиспазматичний засіб застосовується для скорочення гладких м'язів. Відповідно до винаходу, кращими є антиспазматичні засоби, які є ефективними при лікуванні спазматичної активності в травній системі. Таким чином, кращі антиспазматичні засоби є ефективними щодо ослаблення шлунково-кишкових спазмів.

Антиспазматичні засоби включають, але не обмежуються, бутилскополамін, який також відомий як скополаміну бутилбромід, бутилгіосцин і гіосцин бутилбромід. Він присутній на ринку під торговельною назвою Buscopan (бускопан) фірми Boehringer Ingelheim GmbH, Germany.

Відповідно до винаходу можна вводити парасимпатолітичні засоби. Відповідно до винаходу термін "парасимпатолітичні засоби" відноситься до сполуки, композиції або лікарського засобу, які знижують активність парасимпатичної нервової системи. Парасимпатолітичні засоби включають, але не обмежуються, атропін.

Відповідно до винаходу термін "інгібітор протонного насоса" відноситься до сполуки, композиції або лікарського засобу, основною дією яких є значне й тривале зниження вироблення шлункової кислоти.

Інгібітори протонного насоса включають похідні бензимидазолу й похідні імідазопіридину. Приклади інгібіторів протонного насоса включають, але не обмежуються, омепразол (торгові марки: Гасек (Gasec), Лосек (Losec), Прилосек (Prilosec), Зегерид (Zegerid), Оцид (Ocid), Ломак (Lomac), Омепрал (Omepral), Омез (Omez)), лансопразол (торгові марки: Превацид (Prevacid), Зотон (Zoton), Монолітум (Monolitum), Інгібітол (Inhibitol), Левант (Levant), Лупізол (Lupizole)), декслансопразол (торгові марки: Капідекс (Kapidex), Дексилант (Dexilant)), езомепразол (торгові марки: Нексиум (Nexium), Езотрекс (Esotrex), Ессо (esso)), пантопразол (торгові марки:

Протонікс (Protonix), Сомак (Somac), Пантолок (Pantoloc), Пантозол (Pantozol), Зуркал (Zurcal), Зентро (Zentro), Пан (Pan), Контролок (Controloc), Текта (Tecta)), рабепразол (торгові марки: Ацифекс (Aciphex), Париет (Pariet), Еппаз (Erraz), Цехін (Zechin), Рабецид (Rabecid), Nzole-D, Рабелок (Rabeloc), Разо (Razo)) та ілапразол (торгові марки: Ілапро (Ilapro), Лупила (Lupilla), Адиза (Adiza)).

Відповідно до винаходу можна вводити інші сполуки, композиції або лікарські засоби, які проявляють захисну дію на слизову оболонку шлунка, особливо при введенні нестероїдного протизапального лікарського засобу (NSAID).

Наприклад, інші сполуки, композиції або лікарські засоби можна вводити для попередження типового побічного ефекту, утворення виразок шлунка, спричиненого NSAID, зокрема, для попередження індукованих NSAID виразкових хвороб шлунка. В одному варіанті здійснення можна вводити мізопростол, який є синтетичним аналогом простагландину E1 (PGE1), який застосовується для попередження виразкових хвороб шлунка, індукованих NSAID. Мізопростол впливає на парієтальні клітини шлунка, інгібуючи секрецію шлункової кислоти шляхом опосередкованого рецептором, зв'язаного G-білком, інгібування аденілатциклази, що приводить до зниження рівнів внутрішньоклітинного циклічного AMP і зниження активності протонного насоса на апікальній поверхні парієтальної клітини.

Крім того, доведено, що омепразол є ефективним, щонайменше, як мізопростол при лікуванні індукованих NSAID виразок, але значно краще переноситься.

Нестероїдні протизапальні лікарські засоби (NSAID) відносяться до класу лікарських засобів, які забезпечують знеболюючий і жарознижувальний ефекти й у підвищених дозах протизапальні ефекти. Термін "нестероїдні" показує відмінність цих лікарських засобів від стероїдів. Найбільш відомими членами цієї групи лікарських засобів є аспірин, ібупрофен і напроксен.

Одна з основних несприятливих реакцій на лікарський засіб (ADR), пов'язаних з NSAID, відноситься до шлунково-кишкових (GI) ефектів NSAID. Ці ефекти в багатьох випадках є досить серйозними, щоб викликати ризик прориву виразки й шлунково-кишкову кровотечу. NSAID-пацієнти страждають на диспепсію, NSAID-асоційовані несприятливі явища у верхньому відділі шлунково-кишкового тракту, подразнення шлунково-кишкового (GI) тракту й утворення виразок GI. NSAID проявляє подвійну дію на GI тракт: кислі молекули прямо подразнюють слизову оболонку шлунка, та інгібування COX-1 і COX-2 знижує рівні захисних простагландинів. Інгібування синтезу простагландинів в GI тракті викликає підвищення секреції шлункової кислоти, зниження секреції бікарбонату, зниження секреції слизу й зниження трофічних ефектів на слизову оболонку епітелію. Таким чином, відповідно до винаходу, NSAID бажано не вводять. Парацетамол або "ацетамінофен", який не класифікується як NSAID, тому що проявляє тільки слабкі протизапальні ефекти, можна вводити як знеболюючий засіб відповідно до винаходу, однак його може бути недостатньо для керування болем і, таким чином, введення NSAID може стати необхідним, особливо для того, щоб уникнути введення опіатів.

Звичайно побічні ефекти в шлунку (але не обов'язково кишківнику) можуть бути зменшені за допомогою пригнічення вироблення кислоти, шляхом супутнього застосування інгібітору протонного насоса, наприклад, омепразолу, езомепразолу; або простагландинового аналога мізопростолу.

Термін "антиген" відноситься до такого агента, як білок або пептид, який містить епітоп, проти якого спрямована і/або повинна бути спрямована імунна відповідь. У кращому варіанті здійснення антиген є таким пухлино-асоційованим антигеном, як CLDN18.2, тобто компонентом ракових клітин, який може бути отриманий із цитоплазми, клітинної поверхні й клітинного ядра, зокрема таким антигеном, які продукуються, бажано в великих кількостях, внутрішньоклітинно або як поверхневі антигени на ракових клітинах.

У контексті даного винаходу термін "пухлино-асоційований антиген" бажано відноситься до білків, які за нормальних умов специфічно експресуються в обмеженому числі тканин і/або органів, або на специфічних стадіях розвитку, і експресуються або аберантно експресуються в одній або більше пухлинах або ракових тканинах. У контексті даного винаходу пухлино-асоційований антиген бажано пов'язаний із клітинною поверхнею ракової клітини й бажано не експресується або тільки рідко експресується в нормальних тканинах.

Термін "епітоп" відноситься до антигенної детермінанти в молекулі, тобто до частини в молекулі, яка розпізнається імунною системою, наприклад, яка розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи є дискретними тривимірними ділянками на антигені, які розпізнаються імунною системою. Епітопи звичайно складаються з хімічно активних груп, розташованих на поверхні молекул, таких як амінокислотні або цукрові бічні ланцюги, і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічними характеристиками зарядів. Конформаційні й неконформаційні епітопи розрізняють за тим, як в присутності

денатуруючих розчинників зникає зв'язок з першими, але не із другими епітопами. Епітоп білка, такого як CLDN18.2, бажано містить безперервну й переривчасту частину зазначеного білка й містить переважно від 5 до 100, бажано від 5 до 50, краще, від 8 до 30, найкраще, від 10 до 25 амінокислот у довжину, наприклад, бажано епітоп може мати 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 амінокислот у довжину.

Термін "антитіло" відноситься до глікопротеїну, який включає, щонайменше, два важкі (H) ланцюги й два легкі (L) ланцюги, зв'язані між собою дисульфідними зв'язками, і включає будь-яку молекулу, яка містить його антигензв'язувальну ділянку. Термін "антитіло" включає моноклональні антитіла й фрагменти або похідні антитіл, включаючи, без обмеження, антитіла людини, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, наприклад, scFv і антиген-зв'язувальні фрагменти антитіла, такі як фрагменти Fab і Fab' і також включає всі рекомбінантні форми антитіл, наприклад, антитіл, які експресуються в прокаріотах, негліколізовані антитіла й будь-які антиген-зв'язувальні фрагменти антитіл і похідні, описані тут. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (позначеної тут як VH) і константної області важкого ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (позначеної тут як VL) і константної області легкого ланцюга. Області VH і VL можуть додатково підрозділятися на ділянки гіперваріабельності, які називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які перемежуються більш консервативними ділянками, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, розташованих у напрямку від аміно-кінця до карбоксикінця 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-хазяями або факторами, що включають різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Антитіла, описані в даному документі, можуть бути людськими антитілами. Термін "людське антитіло", який тут застосовується, включає антитіло, яке має варіабельну й константну області від батьківських послідовностей імуноглобулінів людини. Людські антитіла, описані тут, можуть включати амінокислотні залишки, які не кодуються батьківськими послідовностями імуноглобулінів людини (наприклад, внаслідок мутації, уведених за допомогою випадкового або сайт-спрямованого мутагенезу *in vitro* або за допомогою соматичної мутації *in vivo*).

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до молекули, яка має у своєму складі ділянку зв'язування антигену, яка значною мірою походить від імуноглобуліну тих видів, які не є людиною, а решта структури молекули імуноглобуліну базується на структурі й/або послідовності імуноглобуліну людини. Ділянка, що зв'язує антиген, може включати повні варіабельні області, об'єднані з константними областями, або тільки ділянки, що визначають комплементарність (CDR), привиті на придатні каркасні ділянки у варіабельних областях. Ділянки, які зв'язують антиген, можуть бути дикого типу або модифікованими за допомогою однієї або декількох амінокислотних замінів, наприклад, модифікованими таким чином, щоб більш точно бути подібними до імуноглобулінів людини. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають усі послідовності CDR (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі шість CDR мишачого антитіла). Інші форми мають один або декілька CDR, які відрізняються від вихідного антитіла.

Термін "химерне антитіло" відноситься до таких антитіл, у яких одна частина кожної амінокислотної послідовності важких і легких ланцюгів гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, які походять від певних видів або які належать до певного класу сегментів, тоді як решта ланцюгів гомологічні відповідних послідовностей з інших видів. Звичайно варіабельна область як у легких, так і у важких ланцюгах імітує варіабельні області антитіл, отриманих від одного виду ссавців, тоді як константні ділянки гомологічні послідовностям антитіл, отриманим від іншого виду. Однією безсумнівною перевагою таких химерних форм є те, що варіабельну область зручно отримувати з відомих на даний час джерел, застосовуючи легко доступні В-клітини або гібридоми з організмів-хазяїв, які не є людиною, у комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, із препаратів клітин людини. У той час як варіабельна область має ту перевагу, яка полягає в легкості одержання й у тому, що специфічність не залежить від джерела одержання, константна область, джерелом якої є людина, менш ймовірно викликає імунну відповідь у суб'єкта-людини при введенні антитіл, ніж це б робила константна область, отримана із джерела, що не є людиною. Однак визначення не обмежене цим специфічним прикладом.

Терміни "антигензв'язувальна ділянка" антитіла (або просто "зв'язувальна ділянка") або "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла (або просто "зв'язувальний фрагмент"), або

аналогічні терміни відносяться до одного або декількох фрагментів антитіла, які зберігають здатність специфічно зв'язуватися з антигеном. Було показано, що антигензв'язувальна функція антитіла може здійснюватися фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язувальних фрагментів, що охоплюють термін "антигензв'язувальна ділянка" антитіла, включають (i) Fab-фрагменти, моновалентні фрагменти, які складаються з доменів VL, VH, CL і CH; (ii) F(ab')₂-фрагменти, бівалентні фрагменти, що включають два Fab-фрагменти, зв'язані дисульфідним містком у шарнірній ділянці; (iii) Fd-фрагменти, які складаються з доменів VH і CH; (iv) Fv-фрагменти, які складаються з доменів VL і VH одного плеча антитіла, (v) dAb-фрагменти (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), які складаються з VH-домена; (vi) ізольовані ділянки, які визначають комплементарність (CDR), і (vii) комбінації двох або більше ізольованих CDR, які можуть бути необов'язково приєднані за допомогою синтетичного лінкера. Крім того, хоча два домени Fv-фрагмента, VL і VH, кодуються різними генами, вони можуть бути з'єднані із застосуванням рекомбінантних методів за допомогою синтетичного лінкера, який дає їм можливість стати єдиним білковим ланцюгом, у якому пара ділянок VL і VH утворює моновалентні молекули (відомі як одноланцюговий Fv (scFv); дивися, наприклад, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; і Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також охоплені терміном "антигензв'язувальна ділянка" антитіла. Ще одним прикладом є злиті білки зв'язувального домена імуноглобуліну, що включають (i) поліпептид зв'язувального домена, який злитий з поліпептидом шарнірної ділянки імуноглобуліну, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, злику із шарнірною ділянкою; і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, злику з константною областю CH₂. Поліпептид зв'язувального домена може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Злиті білки зв'язувального домена імуноглобуліну, крім того, розкриті в заявках US 2003/0118592 і US 2003/0133939. Ці фрагменти антитіла одержують за допомогою загальноприйнятих методик, відомих фахівцям у даній галузі, і проводять скринінг фрагментів на застосування так само, як у випадку інтактних антитіл.

Термін "біспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид або комплекс білка або пептиду, який має дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні, і (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини. Термін "мультиспецифічна молекула" або "гетероспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид або комплекс білка або пептиду, який має більше ніж дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні, (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини, і (c) щонайменше, із ще одним компонентом. Відповідно, винахід включає, але не обмежується, біспецифічні, триспецифічні й інші мультиспецифічні молекули, дія яких спрямована на CLDN18.2 та інші мішені, такі як Fc-рецептори на ефektorних клітинах. Термін "біспецифічні антитіла" також включає диатіла. Диатіла є бівалентними, біспецифічними антитілами, у яких VH- і VL-домени експресуються на одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є занадто коротким, щоб дозволити спарювання двох доменів на одному й тому ж ланцюзі, що змушує домени спаровуватися з комплементарними домонами іншого ланцюга й створювати два антигензв'язувальних сайти (дивися, наприклад, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Антитіло може бути кон'юговане з терапевтичним фрагментом або агентом, таким як цитотоксин, лікарським засобом (наприклад, імуносупресантом) або радіоізотопом. Цитотоксин або цитотоксичний агент включає будь-який агент, який є пагубним для клітин і, зокрема, убиває їх. Приклади включають таксол, цитохалазин B, граміцидін D, етидію бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідрокси антрацин діон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол і піроміцин та їх аналоги або гомологи. Придатні терапевтичні агенти для формування кон'югатів антитіла включають, але не обмежуються, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил декарбазин), алкілюючі агенти (наприклад, мехлоретамін, тіопа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфат, дибромманітол, стрептозотозин, мітоміцин C і цис-дихлордиамін паладію (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (вихідна назва дауноміцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (вихідна назва актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC) і антимітотичні агенти (наприклад, вінкристин і вінбластин). У кращому варіанті здійснення терапевтичний агент є цитотоксичним агентом або радіотоксичним агентом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний агент є імуносупресантом. У ще іншому варіанті здійснення

терапевтичний агент є GM-CSF. У кращому варіанті здійснення терапевтичним агентом є доксорубіцин, цисплатин, блеоміцин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамід або рицин А.

Антитіла також можуть бути кон'юговані з радіоізотопом, наприклад, йоду-131, ітрію-90 або індію-111 для утворення цитотоксичних радіофармацевтичних засобів.

Кон'югати антитіл винаходу можуть бути використані для модифікації заданої біологічної відповіді й фрагмент лікарського засобу не вважається обмеженим класичними хімічними терапевтичними агентами. Наприклад, фрагмент лікарського засобу може бути білком або поліпептидом, який проявляє бажану біологічну активність. Такі білки можуть включати, наприклад, ферментативно активний токсин або його активний фрагмент, такий як абрин, рицин А, екзотоксин псевдонома або токсин дифтерії; білок, такий як фактор некрозу пухлини або інтерферон-γ; або модифікатори біологічної відповіді, такі як, наприклад, лімфокини, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарний макрофагальний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор ("G-CSF"), або інші фактори росту.

Методики для кон'югування такої терапевтичної групи з антитілами добре відомі, дивися, наприклад, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), і Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Термін антитіло "походить" із специфічної батьківської послідовності використовується тут якщо антитіло одержують із системи за допомогою імунізації тварини або за допомогою скринінга бібліотеки генів імуноглобулінів, і якщо відібране антитіло за своєю амінокислотною послідовністю, щонайменше, на 90 %, краще, щонайменше, на 95 %, ще краще, щонайменше, на 96 %, 97 %, 98 % або 99 % є ідентичним до амінокислотної послідовності, яка кодується батьківським геном імуноглобуліну. Звичайне антитіло, яке походить із специфічної батьківської послідовності, буде відрізнятися не більше ніж за 10 амінокислотами, бажано, не більше ніж за 5, або ще краще, не більше ніж за 4, 3, 2 або 1 амінокислотою від амінокислотної послідовності, яка кодується батьківським геном імуноглобуліну.

Використаний тут термін "гетероантитіло" відноситься до двох або більше антитіл, їх похідних або антигензв'язуючих ділянок, які зв'язані разом, щонайменше, два з яких мають різні специфічності. Ці різні специфічності включають специфічність зв'язування з Fc-рецептором на ефektorній клітині й специфічність зв'язування з антигеном або епітопом на клітині-мішені, наприклад, на пухлинній клітині.

Антитіла, описані тут, можуть бути моноклональними антитілами. Термін "моноклональне антитіло", який використовується тут, відноситься до препарату молекул антитіла одного єдиного молекулярного складу. Моноклональне антитіло демонструє той самий сайт специфічного зв'язування й афінність. В одному варіанті здійснення моноклональні антитіла продукують за допомогою гібридоми, яка включає В-клітину, отриману від тварини, яка не є людиною, наприклад, від миші, зливу або іморталізовану клітину.

Антитіла, описані тут, можуть бути рекомбінантними антитілами. Термін "рекомбінантне антитіло", який використовується тут, охоплює всі антитіла, одержані, експресовані, створені або виділені за допомогою рекомбінантних способів, такі як (a) антитіла, виділені із тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною або трансхромосомною щодо генів імуноглобулінів або з отриманих від неї гібридом, (b) антитіла, виділені із клітини-хазяїна, трансформованої з метою експресії антитіла, наприклад, із трансфектоми, (c) антитіла, виділені з бібліотеки рекомбінантних, комбінаторних антитіл, і (d) антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені за допомогою інших способів, які включають сплайсинг послідовностей імуноглобулінових генів, що призводить до інших послідовностей ДНК.

Антитіла, описані тут, можуть бути отримані від різних видів, включаючи, але без обмеження, мишу, пацюка, кролика, морську свинку й людину.

Антитіла, описані в даному документі, включають поліклональні й моноклональні антитіла, і включають IgA-антитіла, такі як IgA1 або IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM і IgD. У різних варіантах здійснення антитіло є IgG1-антитілом, бажано IgG1-антитілом, ізотипом IgG1-каппа

або IgG1-лямбда (тобто IgG1, κ , λ), IgG2a-антитілом (наприклад, IgG2a, κ , λ), IgG2b-антитілом (наприклад, IgG2b, κ , λ), IgG3-антитілом (наприклад, IgG3, κ , λ) або IgG 4-антитілом (наприклад, IgG4, κ , λ).

5 Термін "трансфектома", який використовується тут, включає рекомбінантні еукариотичні клітини-хазяїни, які експресують антитіло, такі як CHO-клітини, NS/0-клітини, HEK293-клітини, HEK293T-клітини, клітини рослин або грибів, включаючи клітини дріжджів.

Використаний тут термін "гетерологічне антитіло" визначений у відношенні трансгенного організму, який продукує таке антитіло. Цей термін відноситься до антитіла, яке має амінокислотну послідовність або послідовність, кодує нуклеїнової кислоти, яка відповідає тій послідовності, яка виявлена в організмі, до складу якого не входить трансгенний організм, і яка звичайно походить від інших видів, які не є трансгенним організмом.

Використаний тут термін "гетерогібридне антитіло" відноситься до антитіла, яке має легкі й важкі ланцюги, які походять від різних організмів. Наприклад, антитіло, яке має важкий ланцюг імуноглобуліну людини, пов'язаний з легким ланцюгом імуноглобуліну миші, є гетерогібридним антитілом.

Винахід включає всі антитіла й похідні антитіл, описані вище, які в контексті винаходу охоплюються терміном "антитіло". Термін "похідні антитіла" відносяться до будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад, кон'югату антитіла й іншого агента або антитіла, або фрагмента антитіла.

20 Описані тут антитіла бажано є виділеними. Використане тут "виділене антитіло" відноситься до антитіла, яке значною мірою є вільним від інших антитіл, які мають іншу антигенну специфічність (наприклад, виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN18.2, значною мірою є вільним від антитіл, які специфічно зв'язують антигени, які не є CLDN18.2). Виділене антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом CLDN18.2 людини, може, однак, проявляти крос-реактивність стосовно інших споріднених антигенів, наприклад, від інших видів (наприклад, видових гомологів CLDN18.2). Крім того, виділене антитіло може бути значною мірою вільним від іншого клітинного матеріалу й/або хімічних реагентів. В одному варіанті здійснення комбінація "виділених" моноклональних антитіл відноситься до антитіл, що мають різну специфічність, які об'єднані в чітко визначену композицію або суміш.

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

Відповідно до даного винаходу антитіло здатне до зв'язування з попередньо визначеною мішенню, якщо воно має значну афінність щодо зазначеної попередньо визначеної мішені й зв'язується із зазначеною попередньо визначеною мішенню в стандартних аналізах. "Афінність" або "афінність зв'язування" часто визначається рівноважною константою дисоціації (K_D). Бажано термін "значна афінність" відноситься до зв'язування з попередньо визначеною мішенню з константою дисоціації (K_D), яка дорівнює 10^{-5} М або нижче, 10^{-6} М або нижче, 10^{-7} М або нижче, 10^{-8} М або нижче, 10^{-9} М або нижче, 10^{-10} М або нижче, 10^{-11} М або нижче, або 10^{-12} М або нижче.

40 Антитіло (власне) не здатне до зв'язування з мішенню, якщо воно не має значної афінності щодо зазначеної мішені й не зв'язується значною мірою, зокрема, не зв'язується із зазначеною мішенню такої міри, що це може бути зафіксовано в стандартних аналізах. Бажано, антитіло не зв'язується із зазначеною мішенню такої міри, що це може бути зафіксовано, у випадку присутності його в концентрації до 2, бажано 10, краще 20, зокрема 50 або 100 мкг/мл або вище. 45 Бажано, антитіло не має значної афінності щодо мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною 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 попередньо встановленою мішенню, з якою антитіло здатне зв'язуватися. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, з якою антитіло здатне зв'язуватися, дорівнює 10^{-7} М, K_D зв'язування з мішенню, у відношенні якої антитіло не має значної афінності, буде дорівнювати, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Антитіло є специфічним відносно попередньо визначеної мішені, якщо воно здатне зв'язуватися із зазначеною попередньо визначеною мішенню, при цьому воно не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, тобто не має значної афінності щодо інших мішеней і не зв'язується значною мірою з іншими мішенями в стандартних аналізах. Відповідно до винаходу антитіло є специфічним у відношенні CLDN18.2, якщо воно здатне зв'язуватися з CLDN18.2, але (власне) не здатне зв'язуватися з іншими мішенями. Бажано, антитіло є специфічним у відношенні CLDN18.2, якщо афінність і зв'язування з такими іншими мішенями значно не перевищують афінність або зв'язування з CLDN18.2-неспорідненими білками, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, людський сироватковий альбумін (HSA) або

неклаудинові трансмембранні білки, такі як молекули MHC або рецептор трансферину, або будь-який інший зазначений поліпептид. Бажано, антитіло є специфічним відносно попередньо визначеної мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною 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 мішенню, щодо якої воно є специфічним. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, щодо якої воно є специфічним, дорівнює 10^{-7} М, K_D зв'язування з мішенню, у відношенні якої воно не є специфічним, буде рівно, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Зв'язування антитіла з мішенню може бути визначене експериментально з використанням будь-якого придатного способу; дивися, наприклад, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), і описані тут способи. Афінності можуть бути легко визначені з використанням звичайних методів, таких як рівноважний діаліз, з використанням приладу Bíascore 2000, з використанням загальних процедур, зазначених виробником; за допомогою радіоімуноаналіза з використанням радіоміченого антигену мішені; або за допомогою іншого способу, відомого фахівцям в даній галузі. Дані афінності можуть бути піддані аналізу, наприклад, за допомогою способу Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Визначена афінність взаємодії конкретної пари антитіло-антиген може змінюватися при вимірюванні за різних умов, наприклад, концентрації солі, pH. Таким чином, вимірювання афінності й інших параметрів зв'язування антигену, наприклад, K_D , IC_{50} , проведені за допомогою стандартизованих розчинів антитіла й антигену, і стандартизованого буфера.

Використаний тут термін "ізотип" відноситься до класу антитіл (наприклад, IgM або IgG1), який кодується генами константної області важких ланцюгів.

Використаний тут вираз "перемикання ізотипів" відноситься до явища, за допомогою якого клас або ізотип антитіла змінюється з одного класу Ig на один з інших класів I

Термін "який зустрічається в природі", який використовується у даному документі щодо об'єкта, відноситься до того факту, що об'єкт може бути виявлений у природі. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, яка існує в організмі (включаючи віруси), яку можна виділити із природного джерела і яка не була спеціально модифікована людиною в лабораторії, є послідовністю, яка зустрічається в природі.

Термін "перегрупувана", який використовується тут, відноситься до конфігурації важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобулінового локусу, у якому сегмент V безпосередньо примикає до сегмента D-J або J-сегменту в конформації, яка кодує практично повний VH- або VI-домен, відповідно. Перегрупуваний локус гена імуноглобуліну (антитіла) можна ідентифікувати шляхом порівняння з батьківською ДНК; перегрупуваний локус буде мати, щонайменше, один рекомбінований елемент гептамерної/нонамерної гомології.

Термін "неперегрупувана" або "батьківська конфігурація", який використовується тут відносно V-сегмента, стосується конфігурації, у якій V-сегмент не є рекомбінованим таким чином, що безпосередньо примикає до сегмента D або J.

Відповідно до винаходу, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитіло, здатне зв'язуватися з епітопом CLDN18.2, бажано епітопом, локалізованим у межах позаклітинних доменів CLDN18.2, зокрема, першого позаклітинного домена, бажано в амінокислотних положеннях з 29 по 78 CLDN18.2. У конкретних варіантах здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є антитілом, здатним зв'язуватися з (i) епітопом CLDN18.2, який не присутній в CLDN18.2, бажано з SEQ ID NO: 3, 4 і 5, (ii) епітопом, локалізованим у петлі CLDN18.2, бажано з SEQ ID NO: 8, (iii) епітопом, локалізованим у петлі 2 CLDN18.2, бажано з SEQ ID NO: 10, (iv) епітопом, локалізованим у петлі D3 CLDN18.2, бажано з SEQ ID NO: 11, (v) епітопом, який включає петлю 1 CLDN18.2 і петлю D3 CLDN18.2, або (vi) негліколізованим епітопом, локалізованим у петлі D3 CLDN18.2, бажано з SEQ ID NO: 9.

Відповідно до винаходу, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано є антитілом, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, але не з CLDN18.1. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним щодо CLDN18.2. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано є антитілом, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, який експресується на клітинній поверхні. В найкращих варіантах здійснення 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 NO: 1, 3-11, 44, 46 і 48-50. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є специфічним у відношенні зазначених вище білків, пептидів або імуногенних фрагментів або їх похідних. Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2,

може бути отримане за допомогою способу, який включає стадію імунізації тварини білком або пептидом, які містять амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 і 48-50 або нуклеїнової кислоти або клітини-хазяїна, яка експресує зазначений білок або пептид. Бажано, антитіло зв'язується з раковими клітинами, зокрема, клітинами тих типів рака, які були зазначені вище, і, бажано, не зв'язується значною мірою з нераковими 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, є раковими клітинами й, зокрема, обрані із групи, яка складається з пухлиногенних клітин раку шлунка, стравоходу, підшлункової залози, легенів, яєчника, товстої кишки, печінки, голови й шиї і жовчного міхура. Бажано, антитіло індукує або опосередковує знищення клітин шляхом індукції одного або більше з між лізису, опосередкованого залежною від комплементу цитотоксичністю (CDC), лізису, опосередкованого залежною від антитіла клітинної цитотоксичністю (ADCC), апоптоза й інгібування проліферації клітин, які експресують CLDN18.2. Бажано, ADCC-опосередкований лізис клітин відбувається в присутності ефektorних клітин, які в конкретних варіантах здійснення обрані із групи, яка складається з моноцитів, мононуклеарних клітин, NK-клітин і PMN. Інгібування проліферації клітин може бути визначене *in vitro* шляхом визначення проліферації клітин в аналізі з використанням бромдеоксиридину (5-бром-2-деоксиридину, BrdU). BrdU є синтетичним нуклеозидом, який є аналогом тимідину й може бути включений у новосинтезовану ДНК реплікуючих клітин (під час S-фази клітинного циклу), замінюючи тимідин під час реплікації ДНК. Виявлення включеної хімічної сполуки з використанням, наприклад, антитіл, специфічних у відношенні BrdU, указує на клітини, які активно реплікували їх ДНК.

У кращих варіантах здійснення, антитіла, описані тут, можуть бути охарактеризовані однією або декількома з між наступних властивостей:

- a) специфічність у відношенні CLDN18.2;
- b) афінність зв'язування з CLDN18.2, яка дорівнює приблизно 100 нМ або менше, бажано, приблизно 5-10 нМ або менше, і, бажано, приблизно 1-3 нМ або менше;
- c) здатність індукувати або опосередковувати CDC на CLDN18.2-позитивних клітинах;
- d) здатність індукувати або опосередковувати ADCC на CLDN18.2-позитивних клітинах;
- e) здатність інгібувати ріст CLDN18.2-позитивних клітин;
- f) здатність індукувати апоптоз CLDN18.2-позитивних клітин.

В найкращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, продукується гібридомною, яка депонована в DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germany; new address: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germany), яка має наступне позначення й номер доступу:

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

Кращі антитіла відповідно до винаходу є антитілами, які продукуються або одержані з описаних вище 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 химеризованими й гуманізованими формами.

Кращі химеризовані антитіла та їх послідовності показані в наступній таблиці.

	клон	mAb	ізотип	Варіабельна область	Химеризоване 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 варіантах здійснення антитіла, зокрема, химеризовані форми антитіл запропоновані винаходом включають антитіла, які включають константну область (CH) важких ланцюгів, яка включає амінокислотну послідовність константної області важких ланцюгів імунoglobуліну людини, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 13 або її фрагментом. У наступних кращих варіантах здійснення антитіла, зокрема, химерні форми антитіл запропоновані винаходом включають антитіла, які включають константну область (CL) легких ланцюгів, яка включає амінокислотну послідовність константної області легких ланцюгів імунoglobуліну людини, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 12 або її фрагментом. В найкращому варіанті здійснення антитіла, зокрема, химерні форми антитіл запропонованих винаходом включають антитіла, які включають CH, яка включає амінокислотну послідовність CH людини, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 13 або її фрагментом, і які включають CL, яка включає амінокислотну послідовність CL людини, таку як амінокислотна послідовність, представлена SEQ ID NO: 12 або її фрагментом.

В одному варіанті здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, є химерним мишачим/людським IgG1 моноклональним антитілом, яке містить каппа, мишачий варіабельний легкий ланцюг, людську константну область каппа легкого ланцюга аллотипа Km(3), мишачу варіабельну область важкого ланцюга, людську константну область IgG1 аллотип G1m(3).

У специфічних кращих варіантах здійснення химерні форми антитіл включають антитіла, які включають важкий ланцюг, який включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 та її фрагмента, і/або легкий ланцюг, який включає, включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 або її фрагмента.

У специфічних кращих варіантах здійснення химерні форми антитіл включають антитіла, які включають комбінацію важких ланцюгів і легких ланцюгів, обраних з наступних можливих варіантів від (i) до (ix), наведених нижче:

(i) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 14 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 21 або її фрагментом;

(ii) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 15 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 20 або її фрагментом;

(iii) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 16 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 22 або її фрагментом;

(iv) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 18 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 25 або її фрагментом;

(v) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 17 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 24 або її фрагментом;

(vi) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 23 або її фрагментом;

5 (vii) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 26 або її фрагментом;

(viii) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 27 або її фрагментом;

10 (ix) важкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 19 або її фрагментом, і легкий ланцюг включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 28 або її фрагментом.

Найкращим є антитіло відповідно до (v).

15 Термін "фрагмент" або "фрагмент амінокислотної послідовності", який використовується вище, відноситься до частини послідовності антитіла, наприклад, до послідовності, яка представлена послідовністю антитіла, укороченої на N- і/або C-кінці, яка, якщо заміняє зазначену послідовність антитіла, то зберігає зв'язування зазначеного антитіла з CLDN18.2 і бажано функції зазначеного антитіла, як описано тут, наприклад, CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис. Бажано, фрагмент амінокислотної послідовності включає, 20 щонайменше, 80 %, бажано, щонайменше, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % амінокислотних залишків зазначеної амінокислотної послідовності. Фрагмент амінокислотної послідовності, обраний 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 відноситься до зазначеної послідовності, з N-кінця якої вилучено 17, 18, 19, 20, 21, 22 або 23 амінокислоти.

25 У кращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає варіабельну область важких ланцюгів (VH), яка включає амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 та її фрагмента.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає варіабельну область легких ланцюгів (VL), яка включає амінокислотну послідовність, обрану із 30 групи, яка складається з SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 та її фрагмента.

У специфічних кращих варіантах здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає комбінацію варіабельної області важких ланцюгів (VH) і варіабельну область легких ланцюгів (VL), обрану з можливих варіантів від (i) до (ix), наведених нижче:

35 (i) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 29 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 36 або її фрагментом;

(ii) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 30 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 35 або її фрагментом;

40 (iii) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 31 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 37 або її фрагментом;

(iv) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 33 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 40 або її 45 фрагментом;

(v) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 32 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 39 або її фрагментом;

50 (vi) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 38 або її фрагментом;

(vii) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 41 або її фрагментом;

55 (viii) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 42 або її фрагментом;

60 (ix) VH включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 34 або її фрагментом, і VL включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 43 або її фрагментом.

Найкращим є антитіло відповідно до (v).

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає VH, що включає набір ділянок, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів від (i) до (vi):

- 5 (i) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 14, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 14, CDR3: положення 116-125 SEQ ID NO: 14;
- (ii) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 15, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 15, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 15;
- (iii) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 16, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 16, CDR3: 10 положення 116-124 SEQ ID NO: 16;
- (iv) CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 17, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 17, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 17;
- (v) CDR1: положення 44-51 SEQ ID NO: 18, CDR2: положення 69-76 SEQ ID NO: 18, CDR3: положення 115-125 SEQ ID NO: 18; i
- 15 (vi) CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає VL, що включає набір ділянок, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів від (i) до (ix):

- 20 (i) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 20, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 20, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 20;
- (ii) CDR1: положення 49-53 SEQ ID NO: 21, CDR2: положення 71-73 SEQ ID NO: 21, CDR3: положення 110-118 SEQ ID NO: 21;
- (iii) CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 22, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 22, CDR3: 25 положення 109-117 SEQ ID NO: 22;
- (iv) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 23, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 23, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 23;
- (v) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 24, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 24, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 24;
- 30 (vi) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 25, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 25, CDR3: положення 115-122 SEQ ID NO: 25;
- (vii) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 26, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 26, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 26;
- (viii) CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 27, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 27, CDR3: 35 положення 115-123 SEQ ID NO: 27; i
- (ix) CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 28, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 28, CDR3: положення 109-117 SEQ ID NO: 28.

У кращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, включає комбінацію VH і VL, кожна з яких включає набір ділянок, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3, обраних з поміж наступних варіантів від (i) до (ix):

- 40 (i) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 14, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 14, CDR3: положення 116-125 SEQ ID NO: 14, VL: CDR1: положення 49-53 SEQ ID NO: 21, CDR2: положення 71-73 SEQ ID NO: 21, CDR3: положення 110-118 SEQ ID NO: 21;
- (ii) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 15, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 15, 45 CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 20, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 20, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 20;
- (iii) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 16, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 16, CDR3: положення 116-124 SEQ ID NO: 16, VL: CDR1: положення 47-52 SEQ ID NO: 22, CDR2: положення 70-72 SEQ ID NO: 22, CDR3: положення 109-117 SEQ ID NO: 22;
- 50 (iv) VH: CDR1: положення 44-51 SEQ ID NO: 18, CDR2: положення 69-76 SEQ ID NO: 18, CDR3: положення 115-125 SEQ ID NO: 18, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 25, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 25, CDR3: положення 115-122 SEQ ID NO: 25;
- (v) VH: CDR1: положення 45-52 SEQ ID NO: 17, CDR2: положення 70-77 SEQ ID NO: 17, CDR3: положення 116-126 SEQ ID NO: 17, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 24, CDR2: 55 положення 76-78 SEQ ID NO: 24, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 24;
- (vi) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 23, CDR2: положення 76-78 SEQ ID NO: 23, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 23;
- (vii) VH: CDR1: положення 45-53 SEQ ID NO: 19, CDR2: положення 71-78 SEQ ID NO: 19, 60 CDR3: положення 117-128 SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: положення 47-58 SEQ ID NO: 26, CDR2:

положення 76-78 SEQ ID NO: 26, CDR3: положення 115-123 SEQ ID NO: 26;

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

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

У наступних кращих варіантах здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано включає одну або декілька ділянок, які визначають комплементарність, (CDR), бажано, щонайменше, CDR 3-варіабельну ділянку, варіабельних областей важких ланцюгів (VH) і/або варіабельних областей легких ланцюгів (VL) моноклонального антитіла проти CLDN18.2, бажано моноклонального антитіла проти CLDN18.2, описаного тут, і бажано включає одну або декілька ділянок, які визначають комплементарність, (CDR), бажано, щонайменше, CDR 3-варіабельну ділянку, варіабельних областей важких ланцюгів (VH) і варіабельних областей легких ланцюгів (VL), описаних в даному документі. В одному варіанті здійснення одна або декілька ділянок, які визначають комплементарність, (CDR) обрані з набору описаних тут ділянок, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3. В найкращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, бажано включає ділянки, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важких ланцюгів (VH) і/або варіабельної області легких ланцюгів (VL) моноклонального антитіла проти CLDN18.2, бажано моноклонального антитіла проти CLDN18.2, описаного тут, і бажано включає ділянки, які визначають комплементарність, CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельних областей важких ланцюгів (VH) і/або варіабельних областей легких ланцюгів (VL), описаних тут.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке включає один або більше CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, включає зазначені CDR разом з їхніми проміжними каркасними ділянками. Бажано, ця частина також буде включати, щонайменше, близько 50 % кожної з поміж першої й четвертої каркасних ділянок або обох разом, при цьому 50 % це 50 % С-кінцевої частини першої каркасної ділянки й це 50 % N-кінцевої частини четвертої каркасної ділянки. Конструювання антитіла, здійснене за допомогою методик рекомбінантних ДНК, може призводити до введення залишків на N- або С-кінці у варіабельних областях, кодованих лінкерами, уведеними для того, щоб полегшити клонування або інші стадії обробки, що включають введення лінкерів для приєднання варіабельних областей даного винаходу до додаткових білкових послідовностей, які включають важкі ланцюги імуноглобулінів, інші варіабельні домени (наприклад, при одержанні димерних антитіл) або білкові мітки.

35 В одному варіанті здійснення антитіло, що включає один або більше CDR, набір CDR або комбінацію наборів CDR, як описано тут, включає зазначені CDR у каркасній ділянці антитіла людини.

Посилання в тексті на антитіло, яке включає в своєму важкому ланцюзі специфічний ланцюг або специфічну ділянку або послідовність, бажано відноситься до випадку, коли всі важкі ланцюги зазначеного антитіла включають зазначений специфічний ланцюг, ділянку або послідовність. Це поширюється й на легкий ланцюг антитіла.

Термін "нуклеїнова кислота", який використовується тут, охоплює ДНК і РНК. Нуклеїнова кислота може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно вона є дволанцюговою ДНК.

45 Відповідно до винаходу термін "експресія" застосовують у його загальному значенні, і він включає утворення ДНК або РНК і білка/пептиду. Зазначений термін також включає часткову експресію нуклеїнових кислот. Крім того, експресія може відбуватися тимчасово або постійно.

Ідея винаходу, представлена в даному документі, відносно послідовностей специфічних амінокислот, наприклад, тих, які показані в перерахованих послідовностях, сформульована таким чином, що також стосується й варіантів зазначених специфічних послідовностей, які в результаті є функціональним еквівалентом зазначених специфічних послідовностей, наприклад, амінокислотних послідовностей, які проявляють властивості, ідентичні або подібні до властивостей специфічних амінокислотних послідовностей. Одна важлива властивість полягає в збереженні зв'язування антитіла з його мішенню або в забезпеченні ефекторних функцій антитіла. Бажано, щоб послідовність, яка є варіантом відносно специфічної послідовності, у випадку, якщо вона заміняє специфічну послідовність в антитілі, зберігала зв'язування зазначеного антитіла з CLDN18.2 і бажано функції зазначеного антитіла, як описано тут, наприклад, лізис, опосередкований CDC або ADCC.

60 Фахівцям у даній галузі слід розуміти, зокрема, що послідовності CDR, гіперваріабельні й варіабельні області можна модифікувати без втрати здатності до зв'язування з CLDN18.2.

Наприклад, CDR-ділянки будуть або ідентичні, або високо гомологічні ділянкам, описаним у даному документі. Під "високогомологічними" ділянками мають на увазі, що в CDR можуть бути зроблені від 1 до 5, бажано від 1 до 4, наприклад, від 1 до 3 або 1, або 2 заміни. Крім того, гіперваріабельні й варіабельні області можуть бути модифіковані таким чином, що вони будуть

демонструвати значну гомологію з областями антитіл, особливим чином розкритим в даному документі.

Для цілей даного винаходу "варіанти" амінокислотної послідовності включають варіанти амінокислотних вставок, варіанти амінокислотних добавок, варіанти амінокислотних делецій і/або варіанти амінокислотних заміни. Варіанти амінокислотних делецій, які включають делецію на N-кінці й/або C-кінці білка, також називаються N-кінцевими й/або C-кінцевими укороченими варіантами.

Варіанти амінокислотних вставок включають вставки однієї або двох, або більше амінокислот у конкретну амінокислотну послідовність. У випадку варіантів амінокислотної послідовності, яка має вставку, один або більше амінокислотних залишків є вставленими в конкретну ділянку в амінокислотній послідовності, хоча можлива також випадкова вставка за даними відповідного скринінга кінцевого продукту.

Варіанти амінокислотного додавання включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття однієї або більше амінокислот, наприклад 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот.

Варіанти амінокислотної делеції характеризуються видаленням однієї або більше амінокислот з послідовності, наприклад, видаленням 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот. Делеції можуть бути зроблені в будь-якому положенні білка.

Варіанти амінокислотного заміщення характеризуються, щонайменше, одним залишком у послідовності, яка вилучена, і іншим залишком, який вставлений на її місце. Перевага віддається модифікаціям у положеннях в амінокислотній послідовності, які не є консервативними між гомологічними білками або пептидами, і/або заміні амінокислот іншими амінокислотами, що проявляють подібні властивості. Бажано, амінокислотні зміни у варіантах білків є консервативними амінокислотними змінами, тобто заміщеннями подібно заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативна амінокислотна зміна включає заміщення однієї із родини амінокислот, яка відноситься до їхніх бічних ланцюгів. Амінокислоти природнього походження звичайно діляться на чотири родини: кислотні (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), і незаряджені полярні (гліцин, аспарагін, глутамат, цистеїн, серин, треонін, тирозин) амінокислоти. Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються разом як ароматичні амінокислоти.

Бажано ступінь подібності, краще, ідентичності між заданою амінокислотною послідовністю й амінокислотною послідовністю, яка є варіантом зазначеної заданої амінокислотної послідовності, буде 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 представлена бажано для ділянки амінокислоти, яка становить щонайменше приблизно 10 %, щонайменше приблизно 20 %, щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 90 % або щонайменше приблизно 100 % від загальної довжини референсної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо референсна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, ступінь подібності або ідентичності представлена для щонайменше 20, щонайменше 40, щонайменше 60, щонайменше 80, щонайменше 100, щонайменше 120, щонайменше 140, щонайменше 160, щонайменше 180 або щонайменше 200 амінокислот, бажано безперервних амінокислот. У кращих варіантах здійснення ступінь подібності або ідентичності представлена для повної довжини референсної амінокислотної послідовності. Вирівнювання для визначення подібності послідовності, бажано ідентичності послідовності може бути зроблене за допомогою відомих у даній галузі інструментів, бажано з використанням найкращого вирівнювання послідовності, наприклад, з використанням Align, з використанням стандартних наборів, бажано EMBOSS:needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Подібність послідовностей" показує відсоток амінокислот, які або є ідентичними, або які представлені консервативними амінокислотними замінами. "Ідентичність послідовностей" між двома амінокислотними послідовностями показує відсоток амінокислот, які в послідовностях є ідентичними.

Термін "відсоток ідентичності" призначений для позначення відсотка амінокислотних залишків, які є ідентичними у двох послідовностей, які підлягають порівнянню, отриманий після

найкращого вирівнювання, цей відсоток є тільки статистичним і різницю між двома послідовностями розподіляють випадковим чином і по всій їхній довжині. Порівняння послідовностей між двома амінокислотними послідовностями звичайно проводять шляхом порівняння цих послідовностей після проведення їх оптимального вирівнювання, при цьому зазначене порівняння проводять за допомогою сегмента або "вікна порівняння" для ідентифікації й порівняння локальних ділянок подібності послідовностей. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння можна одержати не тільки вручну, але й за допомогою алгоритму локальної гомології згідно Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, за допомогою алгоритму локальної гомології згідно Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, за допомогою методу пошуку подібності згідно Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444 або за допомогою комп'ютерних програм, у яких використовують алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N і TFASTA у пакеті програмного забезпечення Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Відсоток ідентичності розраховують за допомогою визначення кількості ідентичних положень у двох порівнюваних послідовностях, ділять цю кількість на кількість порівнюваних положень і множать отриманий результат на 100, щоб знайти відсоток ідентичності між цими двома послідовностями.

Термін "трансгенна тварина" відноситься до тварини, що має геном, який включає один або декілька трансгенів, бажано трансгенів важких і/або легких ланцюгів, або трансхромосоми (інтегровані або не інтегровані в природну геномну ДНК тварини), і яка бажано здатна експресувати трансгени. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген легкого ланцюга імуноглобуліну людини і як трансген важкого ланцюга імуноглобуліну людини, так і трансхромосому важкого ланцюга імуноглобуліну людини, так що миша продукує людські анти-CLDN18.2 антитіла, якщо її імунізують антигеном CLDN18.2 і/або клітинами, які експресують CLDN18.2. Трансген важких ланцюгів імуноглобуліну людини може бути інтегрований у хромосомальну ДНК миші, як і у випадку трансгенних мишей, наприклад, мишей HuMAb, таких як миші HCo7 або HCo12, або трансген важких ланцюгів імуноглобуліну людини може зберігатися поза хромосомами, як у випадку трансхромосомних мишей (наприклад, KM), описаних у патенті WO 02/43478. Такі трансгенні й трансхромосомні миші можуть бути здатні до продукування множинних ізотипів моноклональних антитіл людини до CLDN18.2 (наприклад, IgG, IgA і/або IgE) після D-J-рекомбінації й перемикання ізотипів.

Терміни "скорочення", "зменшення" або "інгібування", які використовуються тут, означають загальне зменшення або здатність викликати загальне зменшення, бажано на 5 % або більше, 10 % або більше, 20 % або більше, краще 50 % або більше, і найкраще 75 % або більше, рівня, наприклад, рівня експресії або рівня проліферації клітин.

Терміни, такі як "збільшення" або "посилення" краще відносяться до збільшення або посилення, щонайменше на 10 %, бажано щонайменше на 20 %, бажано щонайменше на 30 %, краще щонайменше на 40 %, краще щонайменше на 50 %, навіть краще щонайменше на 80 %, і найкраще щонайменше на 100 %, щонайменше на 200 %, щонайменше на 500 %, щонайменше на 1000 %, щонайменше на 10000 % або навіть більше.

Механізм дії mAb

Хоча нижче представлений аналіз механізмів, які лежать в основі терапевтичної ефективності антитіл винаходу, його жодним чином не слід розглядати як такий, що обмежує винахід.

Антитіла, описані в даному документі, бажано взаємодіють із компонентами імунної системи, бажано за допомогою ADCC і CDC. Антитіла запропоновані винаходом можуть бути використані для цілеспрямованої доставки різних агентів (наприклад, радіоізотопів, лікарських засобів або токсинів) з метою безпосереднього знищення пухлинних клітин і можуть бути використані синергічно зі звичайними хімотерапевтичними засобами, які впливають на пухлину через додаткові механізми дії, які можуть включати протипухлинні імунні відповіді, які можуть бути небезпечними внаслідок цитотоксичних побічних ефектів хімотерапевтичних засобів на Т-лімфоцити. Однак антитіла, описані тут, можуть також проявляти ефект просто шляхом зв'язування з CLDN18.2 на клітинній поверхні, таким чином, наприклад, блокуючи проліферацію клітин.

Залежна від антитіл клітинно-опосередкована цитотоксичність

ADCC описує здатність ефекторних клітин, зокрема лімфоцитів, для яких переважно необхідно, щоб клітина-мішень була позначена антитілом, викликати лізис клітин, як описано в даному документі.

ADCC переважно відбувається, якщо антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних

клітинах і Fc-домени антитіла контактують із Fc-рецепторами (FcR) на поверхні імунних ефекторних клітин. Установлено кілька родин Fc-рецепторів, і специфічні популяції клітин звичайно експресують певні Fc-рецептори. ADCC можна розглядати як механізм прямої індукції безпосереднього руйнування пухлини в різному ступені, який призводить до презентації антигенів та індукції спрямованих на пухлину Т-клітинних відповідей. Бажано, індукція ADCC *in vivo* буде призводити до спрямованих на пухлину Т-клітинних відповідей і утворення антитіл в організмі хазяїна.

Комплемент-залежна цитотоксичність

CDC є іншим способом лізису клітин, який може контролюватися антитілами. IgM є найбільш ефективним ізотипом для активації комплементу. Обидва імуноглобуліна IgG1 і IgG3 також є високоефективними при спрямуванні CDC класичним шляхом активації комплементу. Бажано, у цьому каскаді утворення комплексів антиген-антитіло призводить до демаскування множинних ділянок зв'язування C1q у безпосередній близькості від CH2-доменів молекул антитіл, які беруть участь, таких як молекули IgG (C1q є одним із трьох субкомпонентів комплементу C1). Бажано ці демасковані ділянки зв'язування C1q перетворюють раніше низькоафінну взаємодію C1q-IgG на взаємодію з високою авідністю, яке запускає каскад подій, що включають серію білків комплементу й приводить до протеолітичного вивільнення хемотаксичних/активуючих речовин C3a і C5a ефектних клітин. Бажано, комплементний каскад закінчується утворенням мембраноатакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, що полегшують вільне переміщення води й розчинених речовин усередину клітини та з клітини.

Антитіла запропоновані винаходом можна продукувати за допомогою різноманітних методів, що включають загальноприйняті методи створення моноклональних антитіл, наприклад, стандартну методику гібридизації соматичних клітин за Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хоча процедури гібридизації соматичних клітин є кращими, у принципі, можна застосовувати й інші способи одержання моноклональних антитіл, наприклад, вірусну або онкогенну трансформацію В-лімфоцитів або методи фагового дисплея з використанням бібліотеки генів антитіл.

Кращою тваринною моделлю для одержання гібридом, які секретують моноклональні антитіла є система з використанням мишей. Одержання гібридом у мишей є дуже надійною процедурою. Протоколи імунізації й способи виділення імунізованих спленоцитів, призначених для злиття, відомі в даній галузі. Партнери по злиттю (наприклад, клітини мишачої мієломи) і способи злиття також відомі.

Іншими кращими тваринними системами для одержання гібридом, які секретують моноклональні антитіла, є системи з використанням пацюків і кроликів (наприклад такі, як описані в роботі Spieker-Polet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9348 (1995), дивися також роботу Rossi et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 124: 295 (2005)).

У ще одному кращому варіанті здійснення людські моноклональні антитіла можна створити за допомогою трансгенних або трансхромосомних мишей, які мають головним чином компоненти імунної системи людини, а не мишей. Такі трансгенні й трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HumAb і KM, відповідно, і узагальнено називаються тут як "трансгенні миші". Утворення антитіл людини в таких трансгенних мишах можна проводити, як було докладно описано для CD20 в WO2004 035607.

Ще однієї стратегією для утворення моноклональних антитіл є безпосереднє виділення генів, які кодують антитіла, з лімфоцитів, які продукують антитіла певної специфічності, наприклад, дивися роботу Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Більш докладну інформацію про конструювання рекомбінантних антитіл дивися також у роботах Welschhof і Kraus, *Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8 і Benny K.C. Lo *Antibody Engineering* ISBN 1-58829-092-1.

Щоб викликати утворення антитіл, мишей можна імунізувати кон'югованими з носієм пептидами із послідовності антигену, тобто послідовності, проти якої спрямовані антитіла, збагаченими препаратом рекомбінантно експресованого антигену або їх фрагментами й/або клітинами, які експресують антиген, як було описано. Альтернативно, мишей можна імунізувати ДНК, яка кодує антиген, або її фрагментами. У випадку, якщо імунізації з використанням очищеного або збагаченого препарату антигену не дає результату, щоб викликати імунну відповідь, мишей також можна імунізувати клітинами, які експресують антиген, наприклад, клітинною лінією.

За імунною відповіддю можна стежити шляхом ведення протоколу імунізації, зразки плазми й сироватки відбирають із хвостової вени або за допомогою ретроорбітальної кровотечі. Клітини

мишей з досить високим титром імуноглобуліну можуть бути використані для злиття. Мишей за 3 дні перед забиттям і видаленням селезінки можна піддати бустерній імунізації шляхом внутрішньоочеревинної або внутрішньовенної ін'єкції антиген-експресуючих клітин, щоб збільшити розмір гібридом, які секретують специфічне антитіло.

Для створення гібридом, які продукують моноклональні антитіла, клітини спленоцитів і лімфатичних вузлів імунованих мишей можна виділити й провести злиття з придатною лінією іморталізованих клітин, таких як клітинна лінія мишачої мієломи. Потім можна протестувати здатність отриманих гібридом продукувати антиген-специфічні антитіла. Потім за допомогою методу ELISA в окремих комірках можна визначити наявність гібридом, які секретують антитіла. За допомогою імунофлуоресценції й FACS-аналізу, використовуючи клітини, які експресують антиген, можна ідентифікувати антитіла, специфічні до антигену. Гібридами, які секретують антитіла, можна знову висіяти, знову відсортувати й, якщо вони все ще є позитивними щодо моноклональних антитіл, субклонувати за допомогою методу граничних розведень. Стабільні субклони потім можна культивувати *in vitro*, щоб викликати утворення антитіла в тканинному культуральному середовищі для визначення їх характеристик.

Антитіла також можна одержувати в трансфекторі клітин хазяїна, використовуючи, наприклад, комбінацію методів рекомбінантних ДНК і способів трансфекції генів, які добре відомі в даній галузі (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Наприклад, в одному варіанті здійснення ген(и), які представляють інтерес наприклад, гени антитіла, можна лігувати в експресійний вектор, такий як еукаріотична експресійна плазміда, наприклад, така, яку застосовують у системі експресії гена GS, розкрита в WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або інші експресійні системи, добре відомі в даній галузі. Очищену плазмиду з генами клонованого антитіла можна вводити в еукаріотичні клітини-хазяїни, такі як CHO-клітини, NS/0-клітини, HEK293T-клітини або HEK293-клітини, або, альтернативно, інші еукаріотичні клітини, подібні до рослинних клітин, клітин грибів або дріжджів. Спосіб, застосований для введення цих генів, може бути одним з методів, описаних у даній галузі, наприклад, таких як електропорація, застосування ліпофектину, ліпофектаміну тощо. Після введення цих генів антитіл у клітини-хазяїни, клітини, які експресують антитіло, можуть бути ідентифіковані й відібрані. Ці клітини є трансфектантами, які потім можуть бути розмножені до експресійного рівня й вирощені в більшому масштабі для одержання антитіл. Рекомбінантні антитіла можуть бути виділені й очищені з культуральних супернатантів і/або клітин.

Альтернативно, клоновані гени антитіл можуть бути експресовані в інших експресійних системах, що включають прокаріотичні клітини, такі як мікроорганізми, наприклад, *E. Coli*. Крім того, антитіла можуть бути отримані в трансгенних тваринах, які не є людиною, наприклад, у складі овечого або кролячого молока або в складі курячих яєць, або в трансгенних рослинах; дивися, наприклад, роботи Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; і Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Химеризація

Мишачі моноклональні антитіла можна застосовувати для людей як лікувальні антитіла, якщо їх позначити токсинами або радіоактивними ізотопами. Не мічені мишачі антитіла при повторному застосуванні є високоімуногенними для людини, і це приводить до зниження терапевтичного ефекту. Основна імуногенність опосередкована константними областями важких ланцюгів. Імуногенність мишачих антитіл для людини може бути знижена або повністю усунута, якщо відповідні антитіла є химеризованими або гуманізованими. Химерні антитіла є антитілами, різні компоненти яких походять від різних видів тварин, наприклад, це антитіла, які мають варіабельну область мишачого антитіла й константну область імуноглобуліну людини. Химеризація антитіл досягається шляхом приєднання варіабельних областей важкого й легкого ланцюга мишачих антитіл до константної області важкого й легкого ланцюга антитіл людини (наприклад, як це описане в роботі Kraus et al., in *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). У кращому варіанті здійснення химерні антитіла створюють шляхом приєднання константної області легкої каппа-ланцюги імуноглобуліну людини до варіабельної області легких ланцюгів імуноглобуліну миші. У також кращому варіанті здійснення химерні антитіла можна створити шляхом приєднання константної області легкому лямбда-ланцюга імуноглобуліну людини до варіабельної області легких ланцюгів імуноглобуліну миші. Кращими константними областями важких ланцюгів для створення химерних антитіл є IgG1, IgG3 і IgG4. Іншими кращими константними областями важких ланцюгів для створення химерних антитіл є IgG2, IgA, IgD і IgM.

Гуманізація

Антитіла взаємодіють із антигенами-мішенями бажано за допомогою амінокислотних залишків, які розташовані в шести ділянках, які визначають комплементарність, (CDR) важких і

легких ланцюгів. Тому амінокислотні послідовності ділянок CDR серед індивідуальних антитіл різняться сильніше, ніж послідовності, розташовані поза CDR. Оскільки послідовності CDR відповідають за більшу частину взаємодій антитіло-антиген, можливо експресувати рекомбінантні антитіла, які імітують властивості специфічних антитіл, що зустрічаються в природі, за допомогою конструювання експресійних векторів, що включають послідовності CDR зі специфічного антитіла, що зустрічається в природі, пересаджені на каркасні послідовності іншого антитіла з іншими властивостями (дивися, наприклад, роботи 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. U. S. A. 86: 10029-10033). Такі каркасні послідовності можуть бути отримані із загальнодоступних баз даних ДНК, які включають генетичні послідовності генів батьківського антитіла. Ці батьківські послідовності будуть відрізнятися від послідовностей гена зрілого антитіла, оскільки вони не будуть включати повністю укомплектовані змінювані гени, які утворюються шляхом з'єднання V(D)J-возз'єднання в процесі дозрівання В-клітин. Батьківські послідовності також будуть відрізнятися від послідовностей високоафінних вторинних антитіл за всією індивідуальною варіабельною областю.

Здатність антитіла зв'язуватися з антигеном можна визначити за допомогою стандартних аналізів зв'язування (наприклад, ELISA, вестерн-блотинг, імуофлуоресценція й проточно-цитометричний аналіз).

Щоб очистити антитіла, відібрані гібридами можуть бути вирощені у дволітрових обертових колбах, призначених для очищення моноклональних антитіл. Альтернативно, антитіла можуть бути отримані в біореакторах діалізного типу. Супернатанти можна фільтрувати й, за необхідності, концентрувати перед афінною хроматографією на протеїн G-сефарозі або протеїн A-сефарозі. Щоб гарантувати чистоту, елюювання IgG можна контролювати за допомогою гелелектрофореза й високоефективної рідинної хроматографії. Буферний розчин можна поміняти на PBS, і концентрацію можна визначити за оптичним поглинанням при 280 нм, використовуючи коефіцієнт екстинкції, який дорівнює 1,43. Моноклональні антитіла можна розділити по аліквотах і зберігати при -80 °C.

Щоб визначити, чи зв'язуються відібрані моноклональні антитіла зі специфічними епітопами, можна застосовувати сайт-спрямований мутагенез або множинний сайт-спрямований мутагенез.

Щоб визначити ізотип антитіл, можна проводити аналізи ізотипів ELISA з різними комерційними наборами (наприклад, Zymed, Roche Diagnostics). Комірки мікротитрувальних планшетів можуть бути покриті антитілами до Ig миші. Після блокування планшетів проводять реакцію з моноклональними антитілами або очищеними контролями ізотипів за кімнатної температури протягом двох годин. Потім вміст комірок може взаємодіяти з мишачими IgG1-, IgG2a-, IgG2b- або IgG3-, IgA- або IgM-специфічними зразками, кон'югованими з пероксидазою. Після промивання в планшетах при додаванні субстрату ABTS (1 мг/мл) розвивається фарбування, яке аналізують при 405-650 нм. Альтернативно, може бути використаний набір IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027) відповідно до інструкції фірми-виробника.

Щоб продемонструвати присутність антитіл у сироватці крові імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, може бути використаний проточно-цитометричний аналіз. Клітинні лінії, які експресують антиген природно або після трансфекції, і негативні контролі, позбавлені експресії антигену (вирощені в стандартних умовах росту), можна змішувати з різними концентраціями моноклональних антитіл у супернатантах гібридами або в PBS, що містить 1 % ембріональну бичачу сироватку (FBS), та інкубувати при 4 °C протягом 30 хв. Після промивання APC- або Alexa647-мічене антитіло до IgG може зв'язуватися з моноклональним антитілом, яке зв'язало антиген, за тих же самих умов фарбування первинних антитіл. Зразки можна проаналізувати за допомогою проточної цитометрії за допомогою приладу FACS, використовуючи властивості світлового й бічного розсіювання, щоб пропускати одиничні живі клітини. Щоб відрізнити антиген-специфічні моноклональні антитіла від неспецифічно зв'язувальних компонентів в одиничному вимірюванні, можна застосовувати метод ко-трансфекції. Клітини, тимчасово трансфіковані плазмідами, які кодують антиген, і флуоресцентним маркером, можна фарбувати так, як описано вище. Трансфіковані клітини можна виявити в іншому флуоресцентному каналі, а не там, де детектують клітини, пофарбовані антитілами. Оскільки більшість трансфікованих клітин експресують обидва трансгена, антиген-специфічні моноклональні антитіла бажано зв'язуються із клітинами, які експресують флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються на співрозмірному рівні з нетрансфікованими клітинами. На додачу або замість проточної цитометрії може бути використаний альтернативний аналіз із використанням

флуоресцентної мікроскопії. Клітини можуть бути пофарбовані точно так, як описано вище, і досліджені за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Щоб продемонструвати присутність антитіл у сироватці крові імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна застосовувати імунофлуоресцентну мікроскопію. Наприклад, клітинні лінії, які експресують антиген природно або після трансфекції, і негативні контролю, позбавлені експресії антигену, вирощують на предметних стельцях з комірками за стандартних умов росту в середовищі DMEM/F12, доповненому 10 %-ною фетальною телячою сироваткою (FCS), 2 мМ L-глутаміном, 100 МОд/мл пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини потім можна фіксувати метанолом або параформальдегідом або можна залишати необробленими. Потім можна провести реакцію клітин з моноклональними антитілами проти антигену протягом 30 хв. при 25 °С. Після промивання за тих же самих умов можна провести реакцію клітин з Alexa 555-міченими вторинними антитілами до IgG миші (Molecular Probes). Потім клітини можна досліджувати за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Можна одержати клітинні екстракти із клітин, які експресують антиген і придатні негативні контролю, та піддати їх електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфата натрію (SDS). Після електрофорезу розділені антигени переносять на нітроцеллюлозні мембрани, блокують і досліджують за допомогою тестованих моноклональних антитіл. Зв'язування IgG можна виявити за допомогою антитіл до IgG миші, кон'югованих з пероксидазою, і за зміною забарвлення в присутності субстрату посиленої хемілюмінесценції (ECL).

Антитіла можна додатково протестувати на реактивність стосовно антигену за допомогою імуногістохімічного аналізу, який добре відомий фахівцям у даній галузі, наприклад, використовуючи фіксовані параформальдегідом або ацетоном криозрізи або зрізи тканин, залиті парафіном, приготовлені зі зразків неракових тканин або ракових тканин, отриманих від пацієнтів під час звичайних хірургічних операцій або отриманих від мишей, які несуть ксенотрансплантатні пухлини, привиті за допомогою клітинних ліній, які експресують антиген спонтанно або після трансфекції. Для імуофарбування антитіла, реактивні щодо антигену, можна інкубувати із козячими антитілами до мишачих імуноглобулінами або з козячими антитілами до кролячих імуноглобулінів, кон'югованим з пероксидазою хрину (DAKO) відповідно до інструкцій фірми-виробника.

Можна тестувати здатність антитіл опосередковувати фагоцитоз і лізис клітин, які експресують CLDN18.2. Тестування активності моноклональних антитіл *in vitro* забезпечить початковий скринінг перед тестуванням у моделях *in vivo*.

Залежна від антитіл клітинно-опосередкована цитотоксичність (ADCC):

Коротко, поліморфно-ядерні клітини (PMN), NK-клітини, моноцити, мононуклеарні клітини або інші ефекторні клітини від здорових донорів можна очистити шляхом центрифугування в градієнті щільності Ficoll-Нугауе з наступним лізисом домашніх еритроцитів. Промиті ефекторні клітини можна суспендувати в RPMI, доповнені 10 %-ною інактивованою нагріванням фетальною телячою сироваткою або, альтернативно, 5 %-ною інактивованою нагріванням сироваткою людини, і змішати з ⁵¹Cr-міченими клітинами-мішенями, які експресують CLDN18.2, з різним співвідношенням ефекторних клітин і клітин-мішеней. Альтернативно, клітини-мішені можна позначити лігандом, що підсилює флуоресценцію (BATDA). Сильно флуоресцюючий хелат європію з посилюючим лігандом, який вивільняється мертвими клітинами, можна вимірювати за допомогою флуориметра. В іншому альтернативному способі можна застосовувати трансфекцію клітин-мішеней люциферазою. Доданий люцифер жовтий може потім бути окислений тільки життєздатними клітинами. Потім можна додати очищені антитіла до CLDN18.2 класу IgG у різних концентраціях. Ірелевантні IgG людини можуть бути використані як негативний контроль. Аналізи можна проводити протягом від 4 до 20 годин при 37 °С, залежно від типу застосованих ефекторних клітин. Зразки можна аналізувати відносно цитолізу за допомогою вимірювання вивільнення ⁵¹Cr або за присутністю хелата EuTDA у культуральному супернатанті. Альтернативно, люмінесценція, спричинена окисленням люцифера жовтого, може бути показником життєздатних клітин.

Моноклональні антитіла до CLDN18.2 також можна тестувати в різних комбінаціях, щоб визначити, чи посилюється цитоліз множинними моноклональними антитілами.

Залежна від комплекменту цитотоксичність (CDC)

За допомогою різноманітних відомих методів можна протестувати здатність моноклональних антитіл до CLDN18.2 опосередковувати CDC. Наприклад, сироватка крові як джерело комплекменту може бути отримана із крові способом, відомим фахівцям у даній галузі. Щоб визначити CDC-активність mAb, можна застосовувати різні методи. Наприклад, може бути

визначене вивільнення ^{51}Cr або підвищений рівень проникності мембрани можна оцінювати за допомогою аналізу проникності клітин для пропідію йодиду (PI). Коротко, клітини-мішені можна промити й інкубувати їх у кількості $5 \times 10^5/\text{мл}$ з різними концентраціями mAb протягом 10-30 хв. за кімнатної температури або при 37°C . Потім можна додати сироватку або плазму крові в кінцевій концентрації 20 % (об./об.) і інкубувати клітини при 37°C протягом 20-30 хв. Усі клітини з кожного зразка можна додати до розчину PI у пробірку для FACS. Потім суміш може бути негайно проаналізована за допомогою проточно-цитометричного аналізу з використанням приладу FACSAarray.

В альтернативному аналізі індукцію CDC можна визначити на адгезивних клітинах. В одному варіанті здійснення цього аналізу клітини засівають у мікротитрувальні планшети для тканинних культур із плоским дном за 24 год. до аналізу при щільності $3 \times 10^4/\text{комірку}$. Наступного дня середовище росту видаляють і клітини інкубують у трьох повторностях з антитілами. Контрольні клітини інкубують із середовищем росту або середовищем росту, яке містить 0,2 %-ний сапонін для визначення базального рівня лізису й максимального лізису, відповідно. Після інкубації протягом 20 хв. за кімнатної температури видаляють супернатант і до клітин додають 20 %-ну (об./об.) плазму або сироватку крові людини в DMEM (попередньо прогріту до 37°C) і інкубують ще 20 хв. при 37°C . Усі клітини з кожного зразка можна додавати до розчину пропідію йодиду (10 мкг/мл). Потім супернатанти замінюють PBS, що містять 2,5 мкг/мл етидій броміду й при збудженні світлом при 520 нм вимірюють флуоресценцію при 600 нм за допомогою приладу Tecan Safire. Відсоток специфічного лізису розраховують за наступною формулою: % специфічного лізису = (флуоресценція зразка – фонова флуоресценція) / (флуоресценція при максимальному лізисі – фонова флуоресценція) $\times 100$.

Індукція апоптозу й інгібування проліферації клітин моноклональними антитілами:

Щоб протестувати здатність викликати апоптоз, моноклональні антитіла до CLDN18.2 можна, наприклад, інкубувати із CLDN18.2-позитивними пухлинними клітинами, наприклад, з SNU-16, DAN-G, KATO-III або CLDN18.2-трансфікованими пухлинними клітинами при 37°C протягом приблизно 20 годин. Клітини можна зібрати, промити в анексин-V-зв'язувальному буфері (BD biosciences) й інкубувати із анексином V, кон'югованим з FITC або APC (BD biosciences) протягом 15 хв. в темряві. Усі клітини з кожного зразка можуть бути додані до розчину PI (10 мкг/мл в PBS) у пробірку для FACS і негайно проаналізовані за допомогою проточної цитометрії (як описано вище). Альтернативно, загальне інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами можна визначити за допомогою комерційно доступних наборів. Набір DELFIA Cell Proliferation Kit (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) є неізотопним імуоаналізом, заснованим на вимірюванні включення 5-бром-2'-деоксиуридину (BrdU) під час синтезу ДНК проліферуючими клітинами в мікропланшетах. Включений BrdU виявляють за допомогою моноклонального антитіла, міченого європієм. Для забезпечення можливості виявлення антитіл клітини фіксують, а ДНК денатурують за допомогою розчину для фіксації. Антитіло, що не зв'язалося, видаляють промиванням і додають індуктор DELFIA, щоб забезпечити дисоціацію іонів європію із міченого антитіла в розчин, де вони утворюють інтенсивно флуоресцируючі хелати з компонентами індуктора DELFIA. Вимірювана флуоресценція, яка використовує при визначенні флуорометрію з розрізненням у часі, пропорційна до рівня синтезу ДНК у клітині кожної комірки.

Доклінічні дослідження

Моноклональні антитіла, які зв'язуються з CLDN18.2, також можуть бути протестовані в моделі *in vivo* (наприклад, в імунодефіцитних мишей, які несуть ксенотрансплантатні пухлини, привиті за допомогою клітинних ліній, які експресують CLDN18.2, наприклад, ліній DAN-G, SNU-16 або KATO-III, або після трансфекції, наприклад, HEK293) для визначення їх ефективності відносно контролю росту CLDN18.2-експресуючих пухлинних клітин.

Дослідження *in vivo* після ксенотрансплантації CLDN18.2-експресуючих пухлинних клітин у мишей або інших тварин з ослабленим імунітетом можна проводити з використанням антитіл запропонованих винаходом. Антитіла можна вводити мишам, у яких немає пухлин, а потім за допомогою ін'єкції вводити пухлинні клітини для визначення впливу антитіла щодо запобігання утворенню пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлинами. Антитіла можна вводити мишам, які мають пухлину, для визначення терапевтичної ефективності відповідних антитіл відносно зменшення росту пухлини, утворення метастаз або симптомів, пов'язаних з пухлинами. Застосування антитіл можна поєднувати із застосуванням інших речовин, таких як цитостатичні лікарські засоби, інгібітори фактора росту, блокатори клітинного циклу, інгібітори ангиогенеза або інші антитіла для визначення синергійної ефективності й потенційної токсичності комбінацій. Для аналізу токсичних побічних ефектів, опосередкованих антитілами, тваринам можна ввести антитіла або контрольні реагенти й ретельно досліджувати симптоми, які

можливо пов'язані з терапією антитілами до CLDN18.2. Можливі побічні ефекти при застосуванні антитіл до CLDN18.2 in vivo включають токсичність в CLDN18.2-експресуючих тканинах, включаючи шлунок. Антитіла, що розпізнають CLDN18.2 у людини й в інших видів, наприклад у мишей, особливо корисні для прогнозування потенційних побічних ефектів, опосередкованих застосуванням моноклональних антитіл до CLDN18.2 у людини.

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

Сполуки й агенти, описані тут, можна вводити у формі будь-якої придатної фармацевтичної композиції.

Фармацевтичні композиції зазвичай представлені у вигляді стандартної лікарської форми й можуть бути приготовлені відомим способом per se. Наприклад, фармацевтична композиція може бути представлена у формі розчину або суспензії.

Фармацевтична композиція може містити солі, буферні речовини, консерванти, носії, розріджувачі й/або допоміжні речовини, кожен з яких бажано є фармацевтично прийнятними. Термін "фармацевтично прийнятний" відноситься до нетоксичності матеріалу, який не впливає на дію активного компонента фармацевтичної композиції.

Солі, які не є фармацевтично прийнятними, можуть бути використані для приготування фармацевтично прийнятних солей і охоплені винаходом. Фармацевтично прийнятні солі цього типу включають необмежуваним чином такі солі, як отримані з наступних кислот: соляна, бромистоводнева, сірчана, азотна, фосфорна, малеїнова, оцтова, саліцилова, лимонна, мурашина, маленова, бурштинова тощо. Фармацевтично прийнятні солі можуть бути також приготовлені у вигляді солей лужних металів або солей лужноземельних металів, таких як солі натрію, солі калію або солі кальцію.

Придатні буферні речовини для використання у фармацевтичній композиції включають оцтову кислоту у вигляді солі, лимонну кислоту у вигляді солі, борну кислоту у вигляді солі й фосфорну кислоту у вигляді солі.

Придатні консерванти для використання у фармацевтичній композиції включають бензалконію хлорид, хлорбутанол, парабен і тимеросал.

Лікарська форма для ін'єкції може містити фармацевтично прийнятну допоміжну речовину, таку як лактат Рінгера.

Термін "носій" відноситься до органічного або неорганічному компоненту природної або синтетичної природи, у якому міститься активний компонент для сприяння, посилення або забезпечення можливості застосування. Відповідно до винаходу термін "носій" також включає один або кілька сумісних твердих або рідких наповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючих речовин, які є придатними для введення пацієнтові.

Можливими речовинами носія для парентерального введення є, наприклад, стерильна вода, розчин Рінгера, лактат Рінгера, стерильний розчин хлориду натрію, поліалкіленгліколі, гідровані нафталіни й, зокрема, біосумісні лактидні полімери, співполімери лактид/гліколід або співполімери поліоксетилен/поліоксипропілен.

Термін "допоміжна речовина", як він використовується в даному документі позначає всі речовини, які можуть бути присутніми у фармацевтичній композиції і які не є активними інгредієнтами, такі як, наприклад, носії, зв'язувальні речовини, речовини, які полегшують ковзання, загущувачі, поверхнево-активні агенти, консерванти, емульгатори, буфери, смакові агенти або барвники.

Агенти й композиції, описані тут, можна вводити будь-яким загальноприйнятим шляхом, таким як парентеральне введення, включаючи ін'єкцію або інфузію. Кращим є парентеральне введення, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, підшкірне, внутрішньошкірне або внутрішньом'язове.

Композиції, придатні для парентерального введення, зазвичай містять стерильний водний або неводний препарат активної сполуки, який бажано є ізотонічним щодо крові реципієнта. Прикладами сумісних носіїв і розчинників є розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, звичайно стерильні фіксовані олії використовуються як розчин або суспензе середовище.

Агенти й композиції, описані тут, вводять в ефективних кількостях. "Ефективна кількість" відноситься до кількості, яка досягає бажаної реакції або бажаного ефекту окремо або разом з додатковими дозами. У випадку лікування конкретного захворювання або конкретного стану бажана реакція бажано полягає в інгібуванні перебігу захворювання. Це включає уповільнення розвитку захворювання й, зокрема, переривання або зворотний розвиток захворювання.

Бажаною реакцією при лікуванні захворювання або стану може також бути затримка початку або попередження початку розвитку зазначеного захворювання або зазначеного стану.

Ефективна кількість агента або композиції, описаної тут, буде залежати від стану, який підлягає лікуванню, тяжкості захворювання, індивідуальних параметрів пацієнта, включаючи вік, фізіологічний стан, розмір і вагу, тривалість лікування, тип супутньої терапії (у випадку наявності), певний спосіб введення й аналогічні фактори. Відповідно, дози описаних тут агентів, що вводяться, можуть залежати від цих різних параметрів. У випадку, якщо реакція в пацієнта недостатня при введенні початкової дози, можна застосовувати більш високі дози (або ефективним є збільшення дози, яке досягається іншим, більш локалізованим шляхом введення).

Агенти й композиції, описані тут, можна вводити пацієнтам, наприклад, *in vivo*, для лікування або попередження різних порушень, таких як описані тут. Бажано пацієнти включають пацієнтів-людей, які мають порушення, які можуть бути скореговані або інтенсивність яких може бути зменшена шляхом введення описаних тут агентів і композицій. Це включає порушення, при яких залучені клітини, що характеризуються зміненою картиною експресії CLDN18.2.

Наприклад, в одному варіанті здійснення описані тут антитіла можна застосовувати для лікування пацієнта, що має ракове захворювання, наприклад, описане тут ракове захворювання, яке характеризується присутністю ракових клітин, які експресують CLDN18.2.

Фармацевтичні композиції й способи лікування, запропоновані винаходом, можна також застосовувати для імунізації або вакцинації для попередження описаного тут захворювання.

Даний винахід далі проілюстрований наступними прикладами, які не повинні розглядатися як такі, що обмежують обсяг винаходу.

Приклади

Приклад 1. Клінічне, уперше проведене на людині, з одноразовим введенням, багатоцентрове відкрите дослідження фази I з ескалацією дози шляхом внутрішньовенної (*i.v.*) інфузії, яке оцінює безпеку й перенесення IMAB362 у госпіталізованих пацієнтів з гастроєзофагеальним раком пізньої стадії

Клінічне, уперше проведене на людині, з одноразовим введенням, багатоцентрове відкрите дослідження фази I з ескалацією дози шляхом внутрішньовенної (*i.v.*) інфузії в людини з використанням IMAB362 виконували для визначення максимально допустимої або придатної одноразової дози (MTD) IMAB362, вивчення безпеки, перенесення й профілю негативних явищ, викликаних IMAB362, визначення фармакокінетичного профілю одноразових зростаючих доз IMAB362, визначення імуногенності застосування одноразової дози IMAB362, і визначення потенційної протипухлинної активності IMAB362 у пацієнтів з гастроєзофагеальним (GE) раком пізньої стадії.

Дане дослідження було розроблене як уперше проведене на людині, багатоцентрове, нерандомізоване, з ескалацією одноразової дози в різних пацієнтів, відкрите клінічне дослідження фази I з використанням одноразової внутрішньовенної інфузії IMAB362 і періодом наступного спостереження з відсутністю лікування протягом 4 тижнів.

Для включення в дослідження пацієнти повинні задовольняти наступним критеріям включення:

- метастатичне, рефракторне або рецидивуюче захворювання гастроєзофагеальним раком пізньої стадії, підтвердженим гістологією;

- експресія CLDN18.2, підтверджена імуногістохімією або наявність зразка тканини пухлини, придатного для визначення експресії CLDN18.2;

- попередня стандартна хіміотерапія, яка включає фторпіримідин, сполуки платини й/або епірубіцин, і - у випадку, якщо це є клінічно прийнятним – доцетаксел;

- щонайменше один відтинок захворювання, що піддається вимірюванню відповідно до критерію RECIST (комп'ютерна томографія (CT) або магнітно-резонансна томографія (MRT) не раніше, ніж за 6 тижнів до включення в дослідження);

- вік 18 років або старше;

- письмова інформована згода після одержання інформації про дослідження;

- загальний стан (performance status, PS) а шкалою ECOG 0-1 бала або а шкалою Карновського 70-100 %;

- очікувана тривалість життя > 3 місяців;

- кількість тромбоцитів $\geq 100000/\text{мм}^3$;

- гемоглобін ≥ 10 г/дл;

- INR < 1,5;

- білірубін у нормі;

- AST і ALT < 2, 5 рази вище верхньої границі норми (upper limit of normal, ULN) (в 5 раз вище

ULN у випадку наявності метастазів у печінці);

- креатинін $< 1,5 \times \text{ULN}$;

- для жінок з репродуктивним потенціалом (остання менструація менше ніж 2 роки тому до включення в дослідження): Негативний тест на наявність вагітності ($\beta\text{-HCG}$) на початок дослідження й використання двох вискоефективних методів контрацепції протягом 8 тижнів після інфузії досліджуваного лікарського засобу;

- пацієнти чоловічої статі повинні використовувати загальноприйняті методи контрацепції протягом 8 тижнів після інфузії досліджуваного лікарського засобу.

Пацієнти, які задовольняють одному або декільком з наступних критеріїв, не підлягають включенню в дослідження:

- вагітність або годівля грудьми;

- попередня алергічна реакція або неперенесення моноклонального антитіла, включаючи гуманізовані й химерні антитіла;

- попереднє включення в дане дослідження;

- менше 3 тижнів після попередньої протипухлинної хіміотерапії або променевої терапії;

- інші експериментальні препарати або обладнання паралельно або протягом 4 тижнів до даного дослідження;

- інші супутні протипухлинні засоби або терапії;

- історія позитивного тесту на антитіло до вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ);

- відомий гепатит;

- неконтрольоване або важке захворювання, включаючи, але без обмеження, кожне з наступних:

- триваюча або активна інфекція, яка вимагає парентеральних антибіотиків;

- симптоматична застійна серцева недостатність;

- нестабільна стенокардія;

- неконтрольована гіпертонія;

- клінічно значима серцева аритмія;

- інфаркт міокарда протягом останніх 6 місяців;

- шлункова кровотеча протягом останніх чотирьох тижнів;

- симптоматична пептична виразка;

- клінічні симптоми церебральних метастазів або підтверджених результатами лабораторних досліджень метастазів;

- психіатричне захворювання або соціальні ситуації, які будуть перешкоджати прихильності до лікування;

- супутнє введення антикоагулянтних засобів з антагоністами вітаміну К (наприклад, кумадин);

- супутнє введення терапевтичних доз гепарину (профілактичні дози допускаються).

Із загальної кількості 29 пацієнтів 15 пацієнтів одержували досліджуваний лікарський засіб і були віднесені до однієї з дозових когорт (33, 100, 300, 600 або 1000 мг ІМAB362/м²). Ці пацієнти склали вибірку для оцінки безпеки (safety population, SP). Оскільки потенційно дозолімітуючих токсичностей не виникало в жодній із цих дозових груп, тестування додаткових пацієнтів для підтвердження можливих дозолімітуючих токсичностей не було потрібне. Таким чином, досліджуваний лікарський засіб одержували не більше 3 пацієнтів у кожній дозовій когорті, тобто всього 15 пацієнтів.

Розподіл пацієнтів по когортах з різними дозами ІМAB362 подано в таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Розподіл пацієнтів

Дозова когорта ІМAB362	Номер пацієнта
33 мг/м ²	0201
	0103
	0104
100 мг/м ²	0202
	0105
	0203
300 мг/м ²	1101
	0403
	1201

Таблиця 1

Розподіл пацієнтів

Дозова когорта IMAB362	Номер пацієнта
600 мг/м ²	0302
	0204
	1202
1000 мг/м ²	0205
	0106
	0112

Жоден з пацієнтів передчасно не припинив дослідження, тобто всі пацієнти завершили дослідження відповідно до протоколу.

А. ОЦІНКА БЕЗПЕКИ

5 Було виявлено, що IMAB362 є безпечним і добре переноситься.

Тільки 25 небажаних явищ (adverse events, AE), які виникли в 8 пацієнтів, були оцінені як пов'язані із проведеною терапією. Пов'язані із проведеною терапією небажані явища (AE) були подібними між дозовими групами. Більше половини цих небажаних явищ (AE) були порушеннями з боку шлунково-кишкового тракту (в основному нудота, блювота). Тільки одне з пов'язаних із проведеною терапією небажаних явищ (AE) було оцінено як важке (блювота), тоді як усі інші були легкими або помірними. Усі пов'язані із проведеною терапією небажані явища (AE) припинялися, за винятком одного випадку дисгевзії (ступінь 1 згідно СТС (легкий)) з невідомим результатом і випадку підвищеної активності GGT (ступінь 2 згідно СТС (помірний)), яка не відновилася до вихідного рівня.

15 Дозолімітуючої токсичності (DLT), визначеної як небажане явище (AE), пов'язане із проведеною терапією, яке виникає під час або протягом чотирьох тижнів після інфузії досліджуваного лікарського засобу, і яке є токсичністю 3 ступеня (за винятком нудоти) або токсичністю 4 або 5 ступеня (згідно СТС версія 3.0), не спостерігалось в жодній з дозових груп. Таким чином, у даному дослідженні була визначена максимальна одноразова доза (MTD) IMAB362, яка переноситься або є придатною, і яка складає 1000 мг/м².

20 Серйозного небажаного явища (SAE) і ймовірної непередбаченої серйозної небажаної реакції (SUSAR) у даному дослідженні не виникало.

Тільки 7 пацієнтів мали, щонайменше, один лабораторний показник, який виходить за рамки нормальних значень, оцінений як ступінь 3 (важкий). Залежності доза-ефект і чіткого зв'язку з досліджуваним лікарським засобом не спостерігалось. Лабораторних показників 4 ступеня згідно СТС (загроза життю) або 5 (смерть) не відзначалося.

Наприкінці, значимих відмінностей у профілі AE й інших параметрів безпеки між дозовими групами не спостерігалось. У цілому, відзначалося, що IMAB362, який вводиться у вигляді одноразової дози, є безпечним і добре переноситься, при цьому найпоширенішими пов'язаним із проведеною терапією небажаними явищами є нудота й блювота.

В. ОЦІНКА ФАРМАКОКІНЕТИКИ Й ІМУНОГЕННОСТІ

30 Для визначення концентрації лікарського засобу рівні IMAB362 у сироватці крові всіх пацієнтів вимірювали безпосередньо перед інфузією досліджуваного препарату, наприкінці інфузії, через 3, 8, 12 і 24 години після завершення інфузії, і у дні 3 (V3), 5 (V4), 8 (V5), 15 (V6) і 29 (V7).

35 Загальний огляд рівнів IMAB362 у сироватці крові протягом дослідження для кожного пацієнта представлено в таблиці 2. З невідомих причин для одного пацієнта (номер 1201) у дозовій групі 300 мг/м² низький рівень IMAB362 у сироватці крові (12,633 мкг/мл) був визначений ще до інфузії досліджуваного лікарського засобу (V2, день 0).

40

Таблиця 2

Зміна в динаміці у часі рівня ІМАВ362 у сироватці крові [мкг/мл] кожного пацієнта

№ пацієнта	Дозова група ІМАВ362	V2 0 год. після інф.	V2 3 год. після інф.	V2 8 год. після інф.	V2 12 год. після інф.	V2 24 год. після інф.	V3 день 2	V4 день 5 (±1)	V5 день 8 (±1)	V6 день 15 (±2)	V7 день 29 (±7)
0103	33 мг/м ²	14,9	14,6	12,1	13,7	11,7	8,0	5,3	5,4	3,8	1,9
0104	33 мг/м ²	12,5	15,1	12,3	10,1	9,7	11,3	7,0	3,6	2,3	1,3
0201	33 мг/м ²	15,4	12,6	12,7	10,6	11,2	9,5	9,5	6,6	5,3	2,3
0105	100 мг/м ²	75,6	65,8	61,6	63,4	48,8	37,5	24,4	19,0	15,8	11,3
0202	100 мг/м ²	59,3	49,4	47,4	41,2	41,4	35,6	18,5	17,1	12,8	6,4
0203	100 мг/м ²	38,5	36,8	41,1	35,5	36,6	25,4	19,6	18,2	12,6	6,3
0403	300 мг/м ²	-	164,2	161,6	125,0	114,0	90,2	59,8	43,9	20,9	11,4
1101	300 мг/м ²	176,1	171,5	145,5	150,5	146,5	86,3	65,9	65,3	42,7	36,8
1201	300 мг/м ²	153,1	169,5	147,7	124,6	97,8	135,1	124,3	63,7	47,7	33,3
0204	600 мг/м ²	315,7	298,2	285,8	284,3	340,4	218,0	136,7	-	87,5	52,9
0302	600 мг/м ²	361,6	335,0	342,6	285,1	239,1	140,9	82,2	28,4	11,0	2,0
1202	600 мг/м ²	242,2	290,1	281,0	237,6	207,9	170,2	131,6	58,1	37,0	23,6
0106	1000 мг/м ²	493,7	606,1	488,9	465,9	452,7	367,8	259,9	158,8	79,3	34,7
0112	1000 мг/м ²	359,0	465,9	375,9	356,5	311,0	273,1	220,6	192,8	154,1	84,4
0205	1000 мг/м ²	479,7	435,9	366,7	331,6	343,9	279,7	193,9	155,3	105,9	38,9

*Максимальна концентрація (C_{max}) для кожного пацієнта виділена жирним шрифтом

Наявні середні максимальні концентрації (C_{max}) на дозову групу показані в таблиці 3. Зростаючі середні значення C_{max} відповідають зростаючим дозам ІМАВ362, що вводяться шляхом інфузії.

5

Таблиця 3

Максимальні концентрації (C_{max}) ІМАВ362 під час дослідження – зведені дані описової статистики

Дозова група ІМАВ362	C _{max} [мкг/мл]					
	N	Середнє	SD	Min	Медіана	Max
33 мг/м ²	3	15,1	0,3	14,9	15,1	15,4
100 мг/м ²	3	58,7	17,3	41,1	59,3	75,6
300 мг/м ²	3	169,9	5,9	164,2	169,5	176,1
600 мг/м ²	3	330,7	36,7	290,1	340,4	361,6
1000 мг/м ²	3	517,3	77,3	465,9	479,7	606,1

У графічному вигляді середні концентрації ІМАВ362 у крові під час дослідження представлені на Фігурі 1.

10

Найвищі рівні ІМАВ362 були визначені в період часу від безпосереднього завершення інфузії до 8 годин після її завершення. Через 3 години після завершення інфузії середня концентрація ІМАВ362 склала 14,1 мкг/мл у групі 33 мг/м², 50,7 мкг/мл у групі 100 мг/м², 164,2 мкг/мл у групі 300 мг/м², 307,8 мкг/мл у групі 600 мг/м² і 502,6 мкг/мл у групі 1000 мг/м².

15

Фармакокінетика ІМАВ362 є дозозалежною. Найбільш високі рівні доз спостерігалися протягом перших 8 годин після 2-годинної інфузії. Середній період напіввиведення ІМАВ362 складав у цілому 8,5 днів, варіюючи від близько 5 до близько 12 днів у різних дозових групах.

20

У результаті досліджень механізму дії in vitro було визначено, що при концентрації ІМАВ362, яка становить 50 мкг/мл, можна чекати чіткого здійснення ефектів проти пухлинних клітин за допомогою ADCC, CDC і інгібування проліферації, і що значення EC₅₀ ADCC і CDC, які розглядаються як основні механізми дії, покриваються навіть половиною цього рівня концентрації. Виходячи із цього, для більш точної оцінки в дослідженнях багаторазових доз ІМАВ362 були встановлені рівні, які становлять 300 мг/м² і 600 мг/м². Пацієнти, які одержували

IMAB362 у дозі 300 мг/м² і 600 мг/м², очевидно мали вище цих рівнів на день 8 (V5) і близькі до 50 мкг/мл на день 15 (V6).

Ознаки наявності антитіл до лікарського препарату в пацієнтів після цієї одноразової дози IMAB362 були відсутні.

5 С. ОЦІНКА ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ

Первинним критерієм для оцінки потенційної протипухлинної активності був статус пухлини відповідно до класифікації RECIST (версія 1.0) у період з 2 по 5 тиждень після інфузії IMAB362 (V6/V7). Оскільки всі пацієнти завершили дослідження згідно із протоколом, оцінки були зроблені винятково на V7, тобто в період з 4 до 5 тижня після інфузії лікарського засобу. Усіх пацієнтів оцінювали за допомогою СТ.

Три пацієнти не мали вимірюваного захворювання (пацієнти 1101 і 1201 не мали цільового пухлинного вогнища, для пацієнта 0302 відповідні дані були відсутні), але були включені в популяцію для аналізу протипухлинної активності, оскільки це не було офіційною оцінкою ефективності.

В цілому, ні для одного з пацієнтів відповідь не була оцінена як повна або часткова. Стабілізація захворювання спостерігалася в одного з 15 пацієнтів у дозовій групі 600 мг/м². Незважаючи на те, що в пацієнтів, які піддавались лікуванню процентний вміст пухлинних клітин, пофарбованих позитивно щодо CLDN18.2, перебував в діапазоні від 1 % до 80 % (до 50 % пухлинних клітин з фарбуванням мембрани), 90 % або більше пухлинних клітин цього пацієнта були пофарбовані позитивно щодо CLDN18.2 з великою часткою пухлинних клітин, які демонстрували фарбування мембрани. Два пацієнти з дозової групи 300 мг/м² також не продемонстрували прогресу, і оскільки вони не мали цільового пухлинного вогнища, то не могли бути піддані оцінці об'єктивної відповіді пухлини й оцінювалися як non-Cr, non-Pd. Тривалість SD склала близько 2 місяці. Тривалість non-Cr, non-Pd склала близько двох місяців і 6 тижнів, відповідно.

Огляд загальної відповіді пацієнта подано в таблиці 4.

Таблиця 4

Статус пухлини (загальна відповідь) на V7 кожного пацієнта

Дозова когорта IMAB362	Номер пацієнта	Статус пухлини на V7
33 мг/м ²	0103	Прогресування захворювання
	0104	Прогресування захворювання
	0201	Прогресування захворювання
100 мг/м ²	0105	Прогресування захворювання
	0202	Прогресування захворювання
	0203	Прогресування захворювання
300 мг/м ²	0403	Прогресування захворювання
	1101*	non-Cr, non-Pd
	1201*	non-Cr, non-Pd
600 мг/м ²	0204	Стабілізація захворювання
	0302*	Прогресування захворювання
	1202	Прогресування захворювання
1000 мг/м ²	0106	Прогресування захворювання
	0112	Прогресування захворювання
	0205	Прогресування захворювання

*Пацієнти без вимірюваного захворювання (пацієнти 1101 і 1201 не мали цільового пухлинного вогнища, для пацієнта 0302 відповідні дані відсутні)

Різні параметри, що сприяють оцінці статусу пухлини (загальної відповіді) описані далі.

У таблиці 5B представлені дані, які стосуються зміни суми самих довгих діаметрів (цільового пухлинного вогнища), статусу додаткових пухлинних вогнищ після терапії IMAB362, виникнення нових вогнищ, огляд результатів оцінки після терапії IMAB362 (оцінка проведена на V7).

Таблиця 5

Аналіз параметрів для оцінки статусу пухлини на V7 для кожного пацієнта

Дозова група ІМВ362	Номер пацієнта	Процентна зміна суми самих довгих діаметрів у цільовому вогнищі пухлини	Явно виражене прогресування додаткового вогнища	Нові вогнища
33 мг/м ²	0103	+30.2 %	так	немає
	0104	+10.0 %	так	так
	0201	+33.3 %	так	так
100 мг/м ²	0105	+25.9 %	немає	так
	0202	+35.9 %	так	так
	0203	+35.1 %	Додаткове вогнище відсутнє	немає
300 мг/м ²	0403	-37,8 %	так	так
	1101	Основне вогнище відсутнє	Дані відсутні	немає
	1201	Основне вогнище відсутнє	немає	немає
600 мг/м ²	0204	+7,4 %	немає	немає
	0302	Дані відсутні	Дані відсутні	так
	1202	+66,7 %	немає	так
1000 мг/м ²	0106	+36,5 %	немає	так
	0112	+40,0 %	немає	так
	0205	-2,8 %	Додаткове вогнище відсутнє	так

Процентна зміна суми самих довгих діаметрів цільового пухлинного вогнища з V1 до V7 не показала якої-небудь помітної відмінності для різних доз, що вводяться.

Для додаткових вогнищ пухлинного ураження чітко виражене прогресування (з V1 до V7) відзначалося частіше в пацієнтів з більш низькими рівнями доз, але не з рівнями доз 600 мг/м² і 1000 мг/м².

В одного пацієнта в групі 300 мг/м² (0403) чітко виражене прогресування спостерігалось в додатковому пухлинному вогнищі й зменшення самого довгого діаметра в одному лімфатичному вузлі цільового пухлинного вогнища.

Відносно нових вогнищ не спостерігалась переваги якої-небудь однієї з дозових груп.

У випадку пацієнтів 0302 (дозова група 600 мг/м²) і 0205 (дозова група 1000 мг/м²) виникнення нових пухлинних вогнищ було причиною оцінки загальної відповіді як прогресуючого захворювання.

Для оцінки статусу додаткових пухлинних вогнищ згідно RECIST, рівень пухлинних антигенів СА 125, СА 15-3, СА 19-9 і СЕА у сироватці крові визначали в центральній лабораторії на V2 (день 1, перед інфузією), V6 і V7.

Огляд вмісту пухлинних маркерів у сироватці крові для 3 пацієнтів із загальною відповіддю, щонайменше, стабільного захворювання представлений в таблиці 6.

Таблиця 6

Пухлинні маркери в сироватці під час дослідження пацієнтів із загальною відповіддю, щонайменше, стабільного захворювання

Дозова група Номер пацієнта	Пухлинний маркер	Момент часу	Рівень	За межами діапазону референсних значень
300 мг/м ² 1101	СА 125	V2 (до інфузії)	21,2 Од/мл	
		V6	20,6 Од/мл	
		V7	27,7 Од/мл	
	СА 15-3	V2 (до інфузії)	21,3 Од/мл	
		V6	21,0 Од/мл	
		V7	21,3 Од/мл	
	СА 19-9	V2 (до інфузії)	<0,6 Од/мл	

Таблиця 6

Пухлинні маркери в сироватці під час дослідження пацієнтів із загальною відповіддю, щонайменше, стабільного захворювання

Дозова група Номер пацієнта	Пухлинний маркер	Момент часу	Рівень	За межами діапазону референсних значень
	CEA	V6 V7 V2 (до інфузії) V6 V7	<0,6 Од/мл <0,6 Од/мл 1,7 нг/мл 2,0 нг/мл 2,1 нг/мл	
1201	CA 125	V2 (до інфузії) V6 V7	13,5 Од/мл 13,7 Од/мл 11,5 Од/мл	
	CA 15-3	V2 (до інфузії) V6 V7	11,6 Од/мл 11,3 Од/мл 11,3 Од/мл	
	CA 19-9	V2 (до інфузії) V6 V7	68,0 Од/мл 68,8 Од/мл 63,0 Од/мл	так так так
	CEA	V2 (до інфузії) V6 V7	3,2 нг/мл 2,6 нг/мл 3,0 нг/мл	
600 мг/м ² 0204	CA 125	V2 (до інфузії) V6 V7	59,2 Од/мл 50,2 Од/мл 35,1 Од/мл	так так так
	CA 15-3	V2 (до інфузії) V6 V7	477,5 Од/мл 372,3 Од/мл 310,4 Од/мл	так так так
	CA 19-9	V2 (до інфузії) V6 V7	>10000 Од/мл 5667 Од/мл 3979 Од/мл	так так так
	CEA	V2 (до інфузії) V6 V7	40,3 нг/мл 25,2 нг/мл 19,4 нг/мл	так так так

3 3 пацієнтів зі стабілізацією захворювання або Non-CR/Non-PD відповідно до візуалізації два пацієнти мали стабільні рівні пухлинних маркерів у період спостереження. Один пацієнт (0204) продемонстрував значне зниження всіх 4 пухлинних маркерів після лікування. У більшості пацієнтів із прогресуванням захворювання, навпаки, відзначалось підвищення рівнів пухлинних маркерів.

Статус пухлини (відповідно до класифікації RECIST) у період з 4 по 5 тиждень після інфузії IMAB362 (V6/V7) порівнювали зі статусом на момент початку дослідження. У цілому, у жодного з пацієнтів відповідь не була оцінена як повна або часткова. Один з 15 пацієнтів (у дозовій групі 600 мг/м²) продемонстрував стабілізацію захворювання наприкінці дослідження. Два пацієнти в дозовій групі 300 мг/м² з, які мали захворювання, що не піддається вимірюванню, продемонстрували Non-CR/Non-PD. Поряд із цим, рівні пухлинних маркерів у цих трьох пацієнтів залишалися стабільними (2 пацієнта) або навіть значно знизилися (1 пацієнт). Більшість пацієнтів із прогресуванням захворювання продемонстрували збільшення рівнів пухлинних маркерів у динаміці за часом.

Відносно параметрів, які сприяють оцінці статусу пухлини (загальна відповідь), зменшення в одному вогнищі спостерігалось в дозовій групі 300 мг/м². При скринінгу (V1) 13 з 15 пацієнтів мали всього 32 додаткових пухлинних вогнища. Після терапії IMAB362 (оціненої на V7) чітко виражене прогресування додаткового пухлинного вогнища відзначалось всього для 5 пацієнтів, 3 у дозовій групі 33 мг/м², 1 у групі 100 мг/м² і 1 у дозовій групі 300 мг/м². Ні для одного із цих 5 пацієнтів загальна відповідь не була оцінена як прогресування захворювання тільки через прогресування їх додаткових пухлинних вогнищ. Протягом періоду дослідження було

зафіксовано всього 17 нових вогнищ, рівномірно поширених по дозовим групам. У випадку 2 пацієнтів (у дозових групах 600 мг/м² і 1000 мг/м²) виникнення нових вогнищ було причиною оцінки загальної відповіді як прогресування захворювання.

Більше того, додаткові дані, отримані у відібраних пацієнтів, показали, що компоненти сироватки й РВМС пацієнтів є повністю функціональними й активними відносно опосередкування основних механізмів дії IMAB362 CDC і ADCC, відповідно.

Наприкінці, ознаки протипухлинної активності (стабілізація захворювання, зниження пухлинних маркерів) спостерігалися в дозових групах 300 мг/м² і 600 мг/м². Внаслідок малого об'єму вибірки дозових груп важко зробити висновки щодо тенденцій, що стосуються ефективності.

С. ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Дане дослідження розроблене як уперше проведене на людині, многоцентрове, нерандомізоване, з ескалацією одноразової дози в різних пацієнтів, відкрите клінічне дослідження фази I з одноразовою внутрішньовенною інфузією IMAB362 і 4-тижневим періодом спостереження з відсутністю лікування.

Усього 15 пацієнтів одержували досліджуваний препарат і були розподілені в одну з дозових когорт (33, 100, 300, 600 або 1000 мг IMAB362/м²). Дозові групи можуть розглядатися як співрозмірні. Значимих невідповідностей, що стосуються демографічних даних і вихідних характеристик, не спостерігалось.

Щодо основної мети дослідження, у жодній з дозових груп дозолімітуючої токсичності (DLT) не спостерігалось. Таким чином, придатна одноразова доза IMAB362 у даному дослідженні складала 1000 мг/м². IMAB362 був безпечним і добре переносився, при цьому нудота й блювота були найпоширенішими пов'язаними із проведеною терапією несприятливими явищами.

Було виявлено, що профіль АЕ й частота виникнення АЕ подібні в різних дозових групах. Значних відмінностей між дозовими групами не спостерігалось в ряду окремих пацієнтів із клінічно значимими погіршеннями за кожним з гематологічних, біохімічних або коагуляційних параметрів.

Щодо потенційної протипухлинної активності IMAB362 відповідно до критеріїв RECIST повна або часткова відповідь не спостерігалася ні для одного з пацієнтів. Один з 15 пацієнтів (у дозовій групі 600 мг/м²) показав стабілізацію захворювання наприкінці дослідження. Два пацієнти в дозовій групі 300 мг/м² з захворюванням, яке не піддається вимірюванню, продемонстрували Non-CR/Non-PD. Із цих 3 пацієнтів зі стабілізацією захворювання відповідно до візуалізації два пацієнти мали стабільні рівні пухлинних маркерів у період спостереження. Один пацієнт продемонстрував значне зниження всіх 4 пухлинних маркерів після лікування.

І дане і фармакокінетичні дослідження, які показують, що цільові рівні IMAB362 у сироватці досягаються при рівнях доз, які становлять 600 мг/м², підтверджують, що ця доза потребує додаткового дослідження.

Крім того, додаткові дані підтверджують, що імунні ефектори пацієнта є повністю функціональними й активними відносно опосередкування головних механізмів дії IMAB362 CDC і ADCC, відповідно.

Приклад 2. Активність лікарського засобу

Мети аналізів in vitro, виконаних для цієї фази I клінічного дослідження, включали аналіз (i) здатності ефektorних клітин, які присутні у крові пацієнта, індукувати IMAB 362-залежну ADCC; (ii) здатність системи комплементу пацієнта індукувати IMAB 362-залежну CDC; і (iii) зміна здатності IMAB362 індукувати ADCC і CDC після введення пацієнтам.

Різні типи аналізів виконували для дослідження цитолітичної активності, індукованої IMAB362 після введення пацієнтам. Аналізи виконували з використанням сироватки пацієнтів або РВМС пацієнтів, виділених зі зразків крові (таблиця 7). Для порівняння й підтвердження функціональності аналізів CDC і ADCC з використанням сироватки, пул сироваток людини (отриманих від здорових суб'єктів-людей), у якій стерильно розведений свіжоприготовлений IMAB362, був паралельно включений у кожний аналіз. Для тестування функціональності аналізу ADCC з використанням РВМС, клітини крові, ізольовані від здорового донора, використовували як позитивний контроль в тому ж самому аналізі для кожного пацієнта.

А. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Для різних аналізів in vitro зразки сироватки пацієнтів збирали до інфузії IMAB362 і через 1, 7, 14 і 28-32 днів після введення антитіла IMAB362 (таблиця 7). Їх використовували як джерело антитіла IMAB362 і комплементу в CDC, або як джерело антитіла в аналізі ADCC сироватки. Сироватку пацієнтів до інфузії використовували як негативний контроль "без IMAB362" і для розведення зразків сироватки пацієнтів для доведення концентрації IMAB362 до 0,5 мкг/мл. Свіжоприготовлені зразки крові збирали через 14 днів після інфузії (через 7 днів для пацієнта

0203) і використовували як джерело ефекторних клітин для аналізу ADCC.

Таблиця 7

Огляд узятих зразків сироватки й крові для кожного пацієнта. п.о.: зразки сироватки не були отримані з місця проведення клінічного дослідження

Номер пацієнта	Доза IMAB362 [мг/м ²]	До інфузії (так/ні)	Сироватка, отримана після інфузії на день				Кров, отримана на день
0201	33	так	1	7	14	30	14
0202	100	так	1	7	14	28	14
0203	100	так	1	7	14	28	14
0403	300	так	1	7	14	28	7
0204	600	так	1	п.о.	14	32	14
0205	1000	так	1	7	14	30	14

Зразки крові збирали в пацієнтів (таблиця 7), сироватку збирали й розділяли на аліквоти, які негайно поміщали на зберігання при -80 °С. Аналізи всіх цих зразків виконували в одному окремому експерименті після збору всіх 24 зразків сироватки. Для ADCC свіжоприготовлені зразки крові (15 мл Na₂EDTA) використовували для виділення PBMC і наступного дня виконували аналізи ADCC.

Здатність PBMC пацієнтів індукувати ADCC у комбінації з IMAB362 тестували *ex vivo* шляхом використання свіжоприготовлених антикоагульованих за допомогою 15 мл Na₂-EDTA зразків крові, отриманих від пацієнтів через 14 днів (через 7 днів для пацієнта 0203) після введення IMAB362. Після одержання зразків крові PBMC виділяли шляхом центрифугування в градієнті щільності фіколу. PBMC культивували протягом 24 год., і наступного дня виконували аналіз ADCC із трансфікованими люциферазою CLDN18.2-позитивними клітинами раку шлунка людини NUGC4 як мішенями у комбінації з різними концентраціями екзогенно доданого IMAB362. PBMC додавали в співвідношенні Е:Т, яке становило 20:1, і проби інкубували протягом 24 год. при 37 °С, 5 % CO₂. PBMC, отримані від здорового донора, тестували за тих же умов паралельно з аналізом валідності проби (позитивна контрольна проба). Ці вихідні PBMC зберігали в рідкому N₂, і для кожного аналізу ADCC з PBMC пацієнтів відбирали аліквоту із цього вихідного розчину PBMC і аналізували паралельно.

Використовували матеріали з наступними характеристиками:

- CLDN18.2-позитивні клітини-мішені: тимчасово трансфіковані люциферазою клітини раку шлунка NUGC4-10сН11Е10;

- Позитивні контрольні ефекторні клітини: PBMC, отримані від здорового донора (заморожений в N₂-вихідний розчин, партія номер: 276-SMS-09-00706, 4e7c/vial, MNZ, 08.07.07.SJA);

- Функціональне контрольне антитіло: IMAB362 у серійних розведеннях (0,4 нг/мл – 126,5 мкг/мл);

- Негативне контрольне антитіло: контроль ізотипа (ритуксимаб, 126,5 мкг/мл).

Здатність компонентів сироватки пацієнта індукувати комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) у комбінації з IMAB362 аналізували *ex vivo* у динаміці за часом. Зразки сироватки збирали й зберігали при -80 °С, і зразки від усіх пацієнтів аналізували паралельно в цьому ж самому експерименті. Додатково до сироватки до інфузії, у яку була екзогенно додана фіксована кількість 0,5 мкг/мл IMAB362 (що представляє концентрацію *in vitro* EC₅₀), також тестували зразки, зібрані через 1, 7, 14 і 28-32 днів після введення IMAB362, у яких концентрацію циркулюючого IMAB362 доводили до 0,5 мкг/мл (CDC з нормалізацією). Кінцева концентрація в сироватці в кожній пробі була доведена до 20 %. Трансфіковані люциферазою клітини CHO-K1, стабільно трансфіковані CLDN18.2, використовували як мішені. Для порівняння тестували пул сироваток здорових донорів-людей з уведеним IMAB362.

Використовували матеріали з наступними характеристиками:

- CLDN18.2-позитивні клітини-мішені: стабільно трансфіковані клітини CHO-K1 p740 lucі #2A5.

- Аналітичний позитивний контроль: серійні розведення IMAB362 (1:3,16), приготовлені в пулі сироваток людини від здорових донорів, до кінцевих концентрацій у діапазоні від 31,6 нг/мл до 10,0 мкг/мл.

- Функціональне контрольне антитіло: IMAB362, доведене до кінцевої аналітичної

концентрації 0,5 мкг/мл у кожному зразку сироватки до інфузії.

- Аналітичне негативне контрольне антитіло: контролююче ізотип антитіло, розведене в пулі сироваток людини (ритуксимаб).

5 Кінетику загальної цитотоксичності, опосередкованої циркуляцією IMAB362 у людини, а також його здатність індукувати ADCC і CDC аналізували в аналізі "одна пробірка".

Сироватку від кожного пацієнта збирали через 7, 14 і 28-32 днів після внутрішньовенного введення IMAB362 і, таким чином, включаючи фактори комплементу пацієнта плюс циркулюючий IMAB362 тестували в цьому аналізі. Сироватку в кожному аналізі доводили до кінцевої концентрації 25 % (об./об.). PBMC здорових контролів додавали як ефекторні клітини, тоді як клітини NUGC-4 служили клітинами-мішенями у співвідношенні Е:Т, яке дорівнює 40:1.

10 Додатково сироватка була інактивована шляхом нагрівання, руйнуючи активність комплементу. Цей другий аналіз, таким чином, відбиває винятково активність ADCC, індуковану IMAB362, присутнім у сироватці пацієнта.

15 Під час фази I дослідження зразки сироватки збирали й зберігали при -80 °C. Усі зразки, отримані від пацієнтів, аналізували паралельно в цьому ж самому експерименті.

Використовували матеріал з наступними характеристиками:

- CLDN18.2-позитивні клітини-мішені: стабільно трансфіковані люциферазою клітини раку шлунка NUGC-4 10CH11 luciferase #2.

- Ефекторні клітини: PBMC здорового донора (свіжоприготовлена лейкоцитарна плівка).

20 - Функціональне контрольне антитіло: серійні розведення IMAB362 (0,26 нг/мл – 200,0 мкг/мл), уведені в пул сироваток людини.

- Позитивний контрольний зразок: Зразок сироватки пацієнта до інфузії з уведеним IMAB362 (200,0 мкг/мл) (що представляє EC₈₀₋₁₀₀ для IMAB362 у цьому аналізі).

25 - Аналітичне негативне контрольне антитіло: контролююче ізотип антитіло в пулі сироваток людини (ритуксимаб).

Здатність IMAB362 вступати у взаємодію й активувати комплемент, присутній у сироватці пацієнта, та індукувати комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) після тривалої циркуляції в крові пацієнта аналізували ex vivo через 1, 7, 14 і 28-32 днів після введення IMAB362. Аналіз виконували шляхом безпосереднього використання зразків сироватки пацієнтів в аналізі (CDC без нормалізації). Як позитивний контроль використовували сироватку до інфузії, у яку була екзогенно додана фіксована кількість 10 мкг/мл IMAB362 (що представляє концентрацію in vitro EC₉₀₋₁₀₀). Кінцеву концентрацію в сироватці в кожному зразку доводили до 20 %. Як мішені використовували трансфіковані люциферазою клітини CHO-K1, стабільно трансфіковані CLDN18.2. Для порівняння тестували пул сироваток здорових донорів-людей з уведеним IMAB362.

35 Під час фази I дослідження зразки сироватки збирали й зберігали при -80 °C. Усі зразки від пацієнтів аналізували паралельно в цьому ж самому експерименті.

Використовували матеріал з наступними характеристиками:

40 - CLDN18.2-позитивні клітини-мішені: стабільно трансфіковані клітини CHO-K1 p740 luciferase #2A5.

- Функціональне контрольне антитіло: серійні розведення IMAB362 (1:3,16), приготовлені в пулі сироваток людини від здорових донорів, до кінцевої концентрації в діапазоні від 31,6 нг/мл до 10,0 мкг/мл.

45 - Позитивний контрольний зразок: зразки сироватки пацієнта до інфузії, кожний з уведеним IMAB362 (10,0 мкг/мл) (in vitro концентрація CDC-EC₉₀₋₁₀₀).

- Аналітичне негативне контрольне антитіло: контролююче ізотип антитіло, розведене в пулі сироваток людини.

В. РЕЗУЛЬТАТИ

Здатність PBMC пацієнтів опосередковувати ADCC

50 Для аналізу здатності імунних клітин пацієнтів лізувати пухлинні клітини, які експресують CLDN18.2, клітини раку шлунка NUGC-4, які ендogenно експресують CLDN18.2, інкубували із зростаючими концентраціями IMAB362 і PBMC пацієнтів. Проби з PBMC здорового донора включені як функціональний контроль.

55 PBMC пацієнтів продемонстрували залежні від дози IMAB362 швидкості лізису з максимальною величиною від 27 % до 77 % при концентрації ~30 мкг/мл. Це не значно відрізнялося (t-критерій Стюдента для однієї вибірки) від максимальних швидкостей лізису, що становлять від 14 % до 56 %, отриманих з використанням здорових контрольних PBMC, тестованих у таких же аналізах (Фігура 2). Активність ADCC була найбільш значною для пацієнта 0204.

60 Ці дані показують, що PBMC пацієнтів з раком шлунка не гірші у відношенні індукції ADCC

людських CLDN18.2-позитивних клітин раку шлунка в комбінації з IMAB362 у порівнянні з RBMC, отриманими від здорових донорів.

Здатність системи комплементу пацієнтів індукувати CDC

Тестували здатність комплементу пацієнта взаємодіяти з IMAB362, присутнім у сироватці, і індукувати CDC. У зразки сироватки до інфузії вводили 0,5 мкг/мл свіжоприготовленого IMAB362, і активність CDC порівнювали з такою ж концентрацією антитіла, уведеного в пул сироваток людини. Зразки сироватки/антитіла інкубували із клітинами CHO-K1 p740 luc1 #2A5, і лізис визначали через 80 хв. шляхом вимірювання активності люциферази.

Усі пацієнти були здатні індукувати значну CDC у межах 80 хв. (Фігура 3). Для 5 з 6 пацієнтів спостерігалися максимальні швидкості лізису в діапазоні від 50 % до 71 %. Це може бути порівняне з даними, отриманими при паралельному тестуванні з пулом сироваток від здорових контролів (64,5 %). Примітно, що пацієнт 0204 продемонстрував найвищу активність CDC зі свіжеприготовленим IMAB362 (93,9 %).

Здатність розчинних ефекторів у сироватці пацієнтів індукувати знищення клітин за допомогою введеного внутрішньовенно циркулюючого IMAB362

Далі, здатність сироватки пацієнтів взаємодіяти із внутрішньовенно введеним IMAB362 протягом проміжку часу його циркуляції в пацієнта вивчали шляхом тестування зразків сироватки, відібраних у різні моменти часу після введення IMAB362 в аналізах CDC на CLDN18.2-позитивних клітинах-мішенях CHO-K1. Зразки сироватки були джерелом для специфічних для пацієнтів розчинних ефекторів, включаючи комплемент, а також для IMAB362. Концентрації IMAB362 у зразках сироватки визначали за допомогою ELISA (vivoscience) (таблиця 8) і доводили до кінцевої концентрації IMAB362, яка дорівнювала 0,5 мкг/мл (медіана EC₅₀ IMAB362), з використанням як розріджувача відповідної сироватки кожного пацієнта до інфузії. Оскільки концентрації IMAB362 відрізняються залежно від тієї дози, що вводиться, і часу відбору крові, фактор розведення для зразків значно відрізнявся між пацієнтами, змінюючись від 4,6-кратного до 688-кратного. Пул сироваток від здорових донорів (HSC) використовували як контроль (Фігура 4).

У порівнянні з позитивним контролем (сироватка до інфузії відповідного пацієнта + свіжоприготовлений IMAB362) активність знищення клітин зберігалася протягом перших 24 год., тоді як цитолітична активність зразків сироватки, зібраних тижнем пізніше, знижувалася, прогресуючи далі в наступні тижні (Фігура 4). Навіть у цьому випадку значна цитотоксичність здійснювалася сироваткою пацієнтів навіть через 2 тижні після введення IMAB362. Втрата активності CDC через 28-32 дні є значною й найбільш вираженою в пацієнтів, які одержували низькі дози IMAB362 (Фігура 4). Виявилося, що в пацієнтів, які одержували високі дози (0204; 600 мг/м² і 0205; 1000 мг/м²), активність CDC зберігалася краще протягом дослідного періоду. Виходячи з наявних даних, можна зробити висновок про те, що механізм, який лежить в основі цього погіршення дотепер залишається неясним.

Таблиця 8

Концентрації IMAB362 у сироватці пацієнта в різні моменти часу, які використовували в різних аналізах ADCC і CDC.

Номер суб'єкта	Терапія IMAB362 (мг/м ³)	Час після введення IMAB362 (дні)	Конц. IMAB362 у нерозведений сироватці ¹ пацієнта [мкг/мл]	Фактор розведення для одержання 0,5 мкг/мл IMAB362 в аналізах CDC (разове)	Конц. IMAB362 в аналізах цитотоксичності [мкг/мл]	Конц. IMAB362 у не нормалізованих аналізах CDC [мкг/мл]
0201	33	1	11,17	22,34	2,79	2,2
		7	6,63	13,27	1,66	1,4
		14	5,30	10,60	1,32	1,1
		30	2,31	4,62	0,58	0,5
0202	100	1	41,37	82,74	10,34	8,3
		7	17,08	34,15	4,27	3,4
		14	12,78	25,56	3,16	2,6
		28	6,41	12,82	1,60	1,3

Таблиця 8

Концентрації IMAV362 у сироватці пацієнта в різні моменти часу, які використовували в різних аналізах ADCC і CDC.

Номер суб'єкта	Терапія IMAV362 (мг/м ³)	Час після введення IMAV362 (дні)	Конц. IMAV362 у нерозведений сироватці пацієнта [мкг/мл]	Фактор розведення для одержання 0,5 мкг/мл IMAV362 в аналізах CDC (разове)	Конц. IMAV362 в аналізах цитотоксичності [мкг/мл]	Конц. IMAV362 у не нормалізованих аналізах CDC [мкг/мл]
0203	100	1	36,58	73,17	9,15	7,3
		7	18,24	36,48	4,56	3,6
		14	12,63	25,26	3,16	2,5
		28	6,34	12,69	1,59	1,3
0403	300	1	113,40	227,91	28,49	22,8
		7	43,91	87,81	10,98	8,7
		14	20,97	41,95	5,24	4,2
		28	11,41	22,81	2,85	2,3
0204	600	1	340,38	680,76	85,10	68,1
		7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
		14	87,53	175,06	21,88	17,5
		32	52,86	105,72	13,22	10,6
0205	1000	1	343,93	687,86	85,60	68,8
		7	155,28	310,56	38,82	31,1
		14	105,91	211,81	26,48	21,2
		30	38,92	77,84	9,73	7,8

n.a.: дані відсутні; n.d.: виключені, не визначені; ¹концентрація, визначена vivoScience за допомогою ELISA

Вплив компонентів сироватки на індуковану IMAV362 цитотоксичність

ADCC-активність mAB може бути порушена в присутності людської сироватки. Вивчали вплив сироватки пацієнта на активність ADCC. З цією метою сироватку кожного пацієнта відбирали через 7, 14 і 28-32 днів після введення IMAV362 і, таким чином, використовували представляючи фактори комплементу пацієнта плюс циркулюючий уведений внутрішньовенно IMAV362. Усі зразки сироватки пацієнтів розбавляли до кінцевої концентрації сироватки 25 % (об./об.) і розраховували концентрацію, решти IMAV362 у кожному аналітичному зразку пацієнта (таблиця 8). У цьому ADCC-аналізі PBMC одного здорового донора використовували як ефектори і клітини NUGC-4 використовували як клітини-мішені (співвідношення E:T=40:1). Усі аналізи для всіх пацієнтів виконували паралельно в одному експерименті з використання однакових умов, клітин-мішеней і донорних PBMC для забезпечення співрозмірності. Як контроль функціонального аналізу в пул сироваток здорових людей вводили IMAV362 (200,0 мкг/мл). Як додатковий позитивний контроль в індивідуальні зразки сироватки пацієнтів до інфузії вводили 200,0 мкг/мл IMAV362 (що представляє in vitro EC₈₀₋₁₀₀ для IMAV362 у цій системі).

У всіх аналізах спостерігалось, що антитіла IMAV362, присутні в сироватці пацієнта після введення, є високоактивними й індукують цитотоксичність (Фігура 5). Біологічна активність IMAV362 зберігалася протягом 28-32 днів після введення зі специфічним знищенням усе ще вище 48 % у всіх дозових групах. Загальні відмінності між дозовими групами були дивним чином помірними, допускаючи ефект насичення. У пацієнтів, які одержували лікування більш низькими дозами (33-200 мг/м²) помірне зменшення специфічного знищення від 77,7-87,4 % до 48,3-66,8 % спостерігалось протягом часу, який корелює зі зменшенням концентрацій антитіла в сироватці (Фігура 5 верхня група). Найбільш висока активність, яка стабільно зберігалася у часі, спостерігалася в пацієнтів, які одержували лікування IMAV362 у дозі 600 або 1000 мг/м² (Фігура 5 нижня група/панель).

Даний аналіз повторювали зі зразками сироватки, у яких фактори комплементу були інактивовані шляхом їхньої інкубації при 56 °C протягом 30 хв. Цитотоксичність у випадку інактивованих за допомогою нагрівання зразків сироватки пацієнтів була нижче в порівнянні із

цитотоксичністю, отриманою у випадку необроблених зразків сироватки у всіх випадках. Подібні зменшення також спостерігалися з інактивованим за допомогою нагрівання пулом від здорових донорів (HSC, Фігура 6).

У цілому, ці дані вказують на те, що сироватка пацієнтів не інгібує ADCC здатності розчинних компонентів сироватки, але замість цього сприяє загальній цитолітичній активності, індукованій IMAB362.

Кінетика IMAB 362-опосередкованої CDC у сироватці пацієнтів

Для визначення кінетики CDC-здатності IMAB362 у сироватці від пацієнтів різних дозових груп зразки сироватки відбирали через 1, 7, 14 і 28 днів після введення IMAB362.

Знову, ця сироватка служила джерелом для комплементу, а також для IMAB362. Кінцеві концентрації в сироватці доводили до кінцевого об'єму 20 % (об./об.). Кінцеві концентрації IMAB362 у кожному зразку CDC-аналізу наведені в таблиці 7. Як позитивний контроль в зразки від пацієнта до інфузії вводили свіжоприготовлене антитіло IMAB362 до кінцевої концентрації 10 мкг/мл (in vitro EC₉₅ IMAB362 у цій системі CDC-аналізу). Крім того, для функціонального контролю CDC-аналізу готували серійні розведення IMAB362 (0,032-10 мкг/мл) у пулі сироваток людини. Стандартизовану пробу із клітинами CHO-K1, стабільно трансфікованими CLDN18.2 і люциферазою, використовували як клітини-мішені. Усі зразки сироватки відбирали й тестували паралельно в тому самому експерименті.

CDC-активність добре корелює з концентрацією антитіла в кожному зразку сироватки (Фігура 7). Найбільше важливо, дані припускають, що CDC-опосередкована цитотоксична активність зберігається протягом 4 тижнів. Зокрема, пацієнти високих дозових груп не продемонстрували зниження CDC-активності протягом цього часу.

Короткі висновки

Виявилося, що в пацієнтів з GEC не порушена здатність індукувати ADCC і CDC CLDN18.2-експресуючих клітин-мішеней у комбінації з IMAB362. Відзначається, що максимальний лізис, який спостерігався шляхом ADCC і CDC, а також EC₅₀, визначена для ADCC, були найвищими для пацієнта 0204, який мав найбільш значну клінічну й сироваткову відповідь на пухлинний антиген.

Аналізи ex vivo CDC із циркулюючим IMAB362 у різні моменти часу після його введення показали, що ще 2 тижні після введення є досить активна циркуляція IMAB362 у пацієнтів для індукції значних ADCC і CDC.

CDC-активність пацієнтів у комбінації із циркулюючим IMAB362 знижується із часом з невідомих дотепер причин.

Приклад 3. Цитокині

Рівні цитокинів у сироватці можуть слугувати індикаторами імунного статусу пацієнта. У цьому клінічному дослідженні метою аналізу цитокинів у першу чергу було забезпечення контролю безпеки. Цитокині розглядалися в цьому додатковому аналізі з погляду визначення можливих кандидатів у біомаркери.

Рівень цитокинів визначали за 1 день до інфузії IMAB362 і на дні 3 і 5 циклу лікування. Досліджувані цитокині включали прозапальні (IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ , TNF α) і протизапальні (IL-4, IL-10) цитокині, а також цитокині, необхідні для росту й функції Т-клітин (IL-2), і проліферації NK-клітин (IL-2, IL-15).

Цитокині аналізували за допомогою ELISA і проточної цитометрії (Interlab). Цитокині аналізували відповідно до Interlab SOP-MU-IMM.M.0144. 05 "Flow Cytomix Cytokine-Check IL4, IL6, IL13, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL10 IL2, IL1- β , IL12p70, IL8, IL17A, IL23" і SOP-MU-IMM.M.0151.02 "Humanes Interleukin 15".

Рівні цитокинів IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IFN γ і TNF α у сироватці аналізували для 14 з 15 пацієнтів (таблиця 9). Для пацієнта 0403 рівні цитокинів не були визначені (300 мг/м²). Тільки значення рівнів цитокинів у сироватці, які були вищими від діапазону референсних значень, аналізували щодо зміни в часі. Значення референсного діапазону були визначені Interlab (дивися CSR GM-IMAB-001).

Таблиця 9

Рівні цитокінів у сироватці у 1 день, день 3 і день 5

Рівні цитокінів у сироватці всіх пацієнтів вимірювали у 1 день, день 3 і день 5. Референсний діапазон для кожного цитокіну зазначений. Значення нижчі або вищі від межі виявлення для розрахунків приведені у відповідність з межею виявлення.

Пацієнт		0103	0104	0201	0105	0202	0203	1101	1201	0204	0302	1202	0106	0112	0205
Доза [мг/м ²]		33			100			300		600			1000		
Рефе- ренсний діапазон [пг/мл]	День	Прозапальні цитокіни [пг/мл]:													
IL-1 ($<5,2$)	1	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	11,7	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
	3	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
	5	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
IL-6 ($<4,5$)	1	<1,2	<1,2	<1,2	10,7	<1,2	8,3	<1,2	2,6	6,4	4,2	2,8	<1,2	16	4,2
	3	<1,2	25,7	<1,2	5,2	<1,2	5,9	<1,2	2,6	123	4,2	12,5	<1,2	<1,2	2,8
	5	<1,2	11,6	<1,2	5,2	<1,2	7,5	5,3	<1,2	27,9	4,2	23,4	<1,2	<1,2	5,6
IL-12 ($<11,6$)	1	<1,5	<1,5	3,9	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
	3	<1,5	<1,5	3,9	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
	5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
IFN γ ($<45,0$)	1	<1,6	<1,6	182	<1,6	<1,6	26,2	30,7	<1,6	<1,6	<1,6	81,2	<1,6	<1,6	35,9
	3	<1,6	<1,6	173	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
	5	<1,6	<1,6	71,8	<1,6	<1,6	<1,6	3,5	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
TNF α ($<17,5$)	1	<3,2	<3,2	29,8	<3,2	<3,2	10,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
	3	<3,2	<3,2	15,7	<3,2	<3,2	4,6	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
	5	<3,2	<3,2	10,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
Протизапальні цитокіни [пг/мл]:															
IL-4 (20,8)	1	<20,8	<20,8	57,1	<20,8	28,1	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8
	3	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	21,2	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8
	5	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	28,1	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8
IL-10 ($<6,0$)	1	20,7	27,3	38,1	<6,0	20,7	14,1	9,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
	3	19,4	23,3	28,6	<6,0	22,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
	5	20,7	27,3	23,3	<6,0	22,0	<6,0	13,6	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
Цитокіни для функції й проліферації Т-клітин і NK-клітин [пг/мл]:															
IL-2 ($<20,0$)	1	<16,4	<16,4	354	<16,4	55,3	45,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	42,8	<16,4	<16,4	42,8
	3	17,3	<16,4	259	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4
	5	<16,4	<16,4	162	<16,4	<16,4	<16,4	71,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4
IL-15 ($<3,0$)	1	<3,0	698	<3,0	<3,0	51	<3,0	<3,0	18,3	<3,0	<3,0	23,1	<3,0	<3,0	<3,0
	3	<3,0	646	<3,0	<3,0	43	<3,0	<3,0	18,3	<3,0	<3,0	14,7	<3,0	<3,0	<3,0
	5	<3,0	582	<3,0	<3,0	47,7	<3,0	<3,0	11,7	6,0	<3,0	10	<3,0	<3,0	<3,0

Рівні прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ , TNF α) були вищими від відповідних референсних діапазонів у 9 з 14 пацієнтів (0104, 0105, 0201, 0203, 0204, 0112, 1202, 0112, 0205).

- 5 Рівні IFN γ оцінювали у двох пацієнтів (0201, 1202). Рівень TNF α оцінювали в одного із цих двох пацієнтів (0201). В обох пацієнтів рівні IFN γ і TNF α були підвищеними до введення ІМАВ362 і зниженими в наступні дні. Рівні IL-6 були підвищеними у восьми пацієнтів (0104, 0105, 0203, 1101, 0204, 0112, 1202, 0205). Відсутня ясна картина змін рівня IL-6 відносно введення ІМАВ362 і залежності доза-ефект. Рівні IL-6 у пацієнта 0204 (600 мг/м² ІМАВ362) не були підвищеними до введення, але значно підвищилися через 2 дні після інфузії, картина, не виявлена у жодного іншого пацієнта. Рівні IL-1 і IL-12 залишалися в межах відповідного референсного діапазону для всіх пацієнтів.

- 15 Рівні протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10) були вищими відповідного референсного діапазону у 6 з 14 пацієнтів (0103, 0104, 0201, 0202, 0203, 1101). Рівні IL-10 були підвищеними в шести пацієнтів (0103, 0104, 0201, 0202, 0203, 1101), рівні IL-4 були підвищеними у двох із цих пацієнтів (0201, 0202). Коливання рівнів протизапальних цитокінів не показують чіткої картини відносно введення ІМАВ362 і залежності доза-ефект.

- 20 Рівні цитокінів IL-2 в IL-15 для функції й проліферації Т-клітин і NK-клітин були вищими від відповідного референсного діапазону у 9 з 14 пацієнтів (0104, 0201, 0202, 0203, 1101, 1201, 0204, 1202, 0205). Рівні IL-2 були вищими від референсного діапазону у шести пацієнтів (0201, 0202, 0203, 1101, 1202, 0205). Рівні IL-15 були вищими референсного діапазону у п'яти пацієнтів (0104, 0202, 1201, 0204, 1202). Сім з дев'яти пацієнтів (0104, 0201, 0202, 0203, 1201, 1202, 0205) з підвищеними рівнями IL-2/IL-15 до введення продемонстрували зниження рівня цитокінів у наступні дні: рівні IL-2/IL-15 були вищими відповідного референсного діапазону до введення

IMAB362 і знижувалися на другий і четвертий день після введення IMAB362. Найбільш значне зниження в цій групі спостерігалось для концентрацій IL-2 у сироватці. У всіх п'яти пацієнтів (0201, 0202, 0203, 1202, 0205) з підвищеними рівнями IL-2 до інфузії зниження до менш ніж 50 % відповідних рівнів до інфузії спостерігалось на четвертий день після введення. Це зниження може спостерігатися також в одного пацієнта (0201) зі значно підвищеним рівнем IL-2 (354 пгн/мл) до введення 33 мг/м² IMAB362.

Інший профіль концентрації IL-2 був продемонстрований пацієнтом 1101 (300 мг/м² IMAB362) з рівнями IL-2 у референсному діапазоні до інфузії й через 2 дні, але підвищеною концентрацією IL-2 на четвертий день після вливання.

Рівень IL-15 був зниженим на четвертий день після введення у всіх чотирьох пацієнтів (0104, 0202, 1201, 1202) з підвищеними рівнями IL-15 до інфузії. Цей профіль концентрації має значну подібність до профілю концентрації IL-2, що спостерігається, хоча відносне зниження рівня не є вираженим.

Залежність доза-ефект не може бути встановлена для кожного з аналізованих цитокінів.

Резюмуючи вищесказане, аналізи рівнів у пацієнтів до лікування показали, що рівні IL-6, IL-10, IL-2, IL-15 є підвищеними в значної частки пацієнтів з гастроезофагеальним захворюванням пізньої стадії. Напроти, жоден або тільки окремі пацієнти мали підвищені рівні IL-1, IL-12, IL-4, IFN γ і TNF α .

Аналіз зміни рівнів цитокінів протягом перших 5 днів після лікування IMAB362 привів до наступних результатів. Було виявлено, що у всіх п'яти пацієнтів з підвищеними рівнями IL-2 ці рівні значно знизилися, при цьому четверо з п'яти пацієнтів досягли нормальних референсних значень. Аналогічним чином, у всіх чотирьох пацієнтів з підвищеними рівнями IL-15 спостерігалось помірне зниження після введення IMAB362. Зниження підвищених рівнів після лікування також спостерігалось для окремих пацієнтів з підвищеними рівнями IFN γ і TNF α , відповідно. Напроти, рівень IL-6 підвищився після введення IMAB362, при цьому четверо пацієнтів до лікування й 7 з 14 пацієнтів на день 5 після лікування продемонстрували IL-6 вище референсних рівнів.

Приклад 4. Міжнародне, багатоцентрове, відкрите дослідження фази IIa з використанням багаторазових доз, яке оцінює ефективність і безпеку багаторазових доз IMAB362 у пацієнтів з аденокарциномою шлунка або нижнього відділу стравоходу пізньої стадії

Міжнародне, багатоцентрове, відкрите дослідження фази IIa з використанням багаторазових доз проводили для вивчення ефективності й безпеки багаторазових доз IMAB362 у пацієнтів з аденокарциномою шлунка або нижнього відділу стравоходу пізньої стадії. Головною метою даного дослідження було дослідження швидкості ремісії (CR, PR) відповідно до RECIST. Додатковими цілями даного дослідження були: частота й тяжкість небажаних явищ згідно CTCv3.0 і перенесення багаторазових доз IMAB362; час виживання без прогресування (PFS): час від початку першої інфузії до дати першого прогресування захворювання, яке спостерігається, або смерті з будь-якої причини (незалежно від того, що виникає в першу чергу); імунотоксичність за даними аналізу людських антихимерних антитіл; якість життя; частота клінічної ефективності (CR, PR і SD відповідно до RECIST); і фармакокінетика IMAB362 за рівнями у сироватці.

Пацієнти зазнали скринінгу на визначення присутності CLDN18.2-мішені для IMAB362 у їхніх пухлинах. Статус CLDN18.2 визначали за допомогою імуногістохімії за допомогою антитіла до клаудину-18 відповідно зі стандартизованим протоколом. У дослідження були включені пацієнти з пухлинами, щонайменше, 50 % клітин яких були пофарбовані з інтенсивністю, щонайменше, 2+ (подвійна інтенсивність). Критерії включення й виключення перевіряли під час скринінгового візиту (V1). Пацієнтів набирали з університетських госпіталів, які спеціалізуються на лікуванні гастроезофагеального рака.

Пацієнти повинні задовольняти всім наступним критеріям включення:

- Метастатичне, рефракторне або рецидивуюче захворювання аденокарциноми шлунка або нижнього відділу стравоходу пізньої стадії, підтверджене гістологією,

- Експресія CLDN18.2, підтверджена імуногістохімією залитого в парафін зразка пухлинної тканини, щонайменше, в 50 % пухлинних клітин з інтенсивністю фарбування, щонайменше, 2+ (за шкалою від 0 до 3+),

- Щонайменше, один відтинок захворювання, що піддається вимірюванню відповідно до критерію RECIST (проведення комп'ютерної томографії (СТ) або магнітно-резонансної томографії (MRI) не раніше, ніж за 2 тижні до візиту 2),

- Вік \geq 18 років,

- Письмова інформована згода,

- Загальний стан здоров'я а шкалою ECOG (PS) 0-1 або індекс Карновського 70-100 %,

- Очікувана тривалість життя > 3 місяців,
- Кількість тромбоцитів $\geq 100000/\text{мм}^3$,
- Гемоглобін ≥ 10 г/дл,
- Білірубін у нормі,
- 5 - AST і ALT < 2,5 раз перевищує верхню межу норми (ULN) (в 5 разів перевищує ULN у випадку присутності метастазів у печінці),
- Креатинін < $1,5 \times \text{ULN}$,
- Для жінок з репродуктивним потенціалом (остання менструація менше ніж за 2 роки до включення): Негативний тест на наявність вагітності (β -HCG) на момент початку дослідження й
- 10 використання двох високоефективних способів контрацепції під час фази лікування й протягом 8 тижнів після останньої інфузії досліджуваного лікарського засобу,
- Пацієнти чоловічої статі, у яких сексуальними партнерами були жінки з репродуктивним потенціалом, повинні використовувати схвалений спосіб контрацепції під час фази лікування й протягом 8 тижнів після останньої інфузії досліджуваного лікарського засобу.
- 15 Пацієнти, які задовольняють будь-якому одному або декільком з наступних критеріїв виключення, не допускаються до включення в дослідження:
- Вагітність або годівля грудьми
- Попередня важка алергічна реакція або неперенесення моноклонального антитіла, включаючи гуманізовані або химерні антитіла
- 20 - Менше 3 тижнів після попередньої хіміо- або променевої терапії
- Інші експериментальні препарати або обладнання одночасно або в межах 4 тижнів до даного дослідження
- Інші супутні протиракові терапії (не за показниками даного дослідження)
- Відома ВІЛ-інфекція або відомий активний гепатит (А, В, С)
- 25 - Супутня антикоагуляція з антагоністами вітаміну К (наприклад, кумадин, маркумар)
- Терапевтичні дози гепарину (профілактичні дози допускаються)
- Неконтрольоване захворювання, включаючи, але без обмеження кожне з наступних:
- Триваюча або активна інфекція, яка вимагає парентеральних антибіотиків
- Серцева недостатність із застійними явищами
- 30 - Нестабільна стенокардія
- Неконтрольована гіпертонія
- Клінічно значима серцева аритмія
- Інфаркт міокарда протягом останніх 6 місяців
- виразка шлунка протягом останніх чотирьох тижнів, яка кровоточить,
- 35 - Симптоматична пептична виразка
- Клінічні симптоми метастазів у головному мозку
- Психіатричне захворювання або соціальні ситуації, які перешкоджають прихильності лікуванню.

Усі пацієнти всіх когорт одержували повторні дози IMAB362 кожні два тижні під час візитів 2, 40 5, 6, 7 і 8 (5 застосувань). Процедури з ескалацією дози охоплювали наступні когорти із двома різними дозам (антитіло/площа поверхні тіла) IMAB362:

Когорта 1: 300 мг/м^2

Когорта 2: 600 мг/м^2

Когорта 3: 600 мг/м^2

45 Розчин антитіла вводили у вигляді 2 годинної внутрішньовенної інфузії кожні два тижні. Важливо, щоб тривалість інфузії становила не менше 2 годин. Для інфузії слід використовувати інфузійну систему (наприклад, Infusomat® fmS) для контролю часу інфузії. Для застосування лікарського засобу слід використовувати набір для інфузії, що поставляється разом з досліджуваним лікарським засобом, який був протестований виробником на сумісність. Інфузію

50 лікарського засобу слід проводити вранці. Кваліфікований лікар повинен бути доступний під час інфузії й протягом 24 годин після інфузії.

Тридцять сім пацієнтів одержували, щонайменше, одну терапію. На жаль, для 3 з них у базі даних є неповна документація, тому до популяції пацієнтів, які одержали хоча б одну дозу досліджуваного препарату (all patients treated set, APT set), будуть включені 34 пацієнта й

55 використані для аналізу безпеки. 4, 6 і 24 пацієнта розподіляли відповідно в когорту 1 з 300 мг/м^2 IMAB362, когорту 2 з 600 мг/м^2 IMAB362 і когорту 3 з 600 мг/м^2 IMAB362.

Під час фази лікування один пацієнт із когорти 1, три пацієнти з когорти 2 і 12 пацієнтів з когорти 3 перервали дослідження до одержання 5 інфузій IMAB362 і завершили візит 9 (включаючи другу візуалізацію пухлини) через два тижні після п'ятої інфузії. Ці пацієнти були

60 замінені.

Два пацієнти в когорті 2 не мали вимірюваного захворювання на момент початку дослідження й були виключені з аналізів ефективності. Виникали незначні відхилення від протоколу, такі як оцінка пухлини на вихідному рівні на > 14 днів раніше, ніж візит 2 (n=3; 8,8 %), гемоглобін <10 г/дл (n=5; 14,7 %) показники, що відхиляються від норми, білірубину (n=3, 8,8 %), ALT або AST > 2,5 ULN (>5 ULN у випадку метастазів у печінці) (n=2; 5,9 %), показник для креатиніну >1,5 ULN (n=1; 2,9 %) і збільшений проміжок часу (>15 днів) між періодом скринінга й початком лікування (n=2; 5,9 %), але не приводили до виключення з будь-якого аналізу. Один пацієнт мав інфаркт міокарда протягом останніх 6 місяців. Відмова від виконання була надана.

Оскільки в когорті 2 і 3 пацієнти одержували однакову дозу, яка складала 600 мг/м², було вирішено аналізувати цих пацієнтів як одну групу. Усі пацієнти (n=34) АРТ-популяції належали до білої (кавказоїдної) раси. Середній вік склав 62 роки (45-65 років) у дозовій групі 300 мг/м² і 61 рік (42-77 років) у дозовій групі 600 мг/м².

Огляд локалізації рака й результат гістопатологічної оцінки показані в Таблиці 10. Середній період часу між першим діагнозом і скринінгом візитом для цієї групи склав 16 місяців (мінімум 2,7/ максимум 56). Статус експресії HER2/neu був в основному невідомим для пацієнтів, за винятком 5 пацієнтів, що одержували лікування 600 мг/м². Один із цих 5 пацієнтів був Her2/neu-позитивним.

Система класифікації ступенів онкологічних захворювань (TNM) була встановлена для раку шлунка (n=16) і стравоходу або гастроезофагеального з'єднання (n=19). В АРТ-популяції 25 % пацієнтів, представлених з первинними пухлинами шлунка, були класифіковані з T1 або 2, 31 % представлених з T3, 25 % з T4 первинними пухлинами й для 19 % цей показник був невідомим. Шістдесят дев'ять (69) % пацієнтів в АРТ-популяції мали, щонайменше, один або два інфільтровані лімфатичні вузли, позначені згідно із класифікацією N1, і 56 % пацієнтів, мали периферійні метастази (M1) на момент постановки діагнозу. Шістдесят дев'ять (69 %) пацієнтів з раком стравоходу або гастроезофагеального з'єднання були діагностовані з \geq T3. Щонайменше про один або два інфільтрованих лімфатичних вузли (N1) повідомлялося для 84 % пацієнтів. Крім того, 84 % пацієнтів мали периферійні метастази.

Таблиця 10

Огляд локалізації й типу пухлини під час першої постановки діагнозу
(Один пацієнт мав рак стравоходу й шлунка; декілька пацієнтів мали рак шлунка, що вразив різні відділи шлунка)

	300 мг/м ² N (%)	600 мг/м ² N (%)	АРТ-популяція N (%)
Число пацієнтів	4	30	34
Стравохід	-	2 (6,7)	2 (6,7)
Гастроезофагеальне з'єднання	1 (25,0)	16 (53,3)	17 (50,0)
дистальний	-	4	4
кардіальний	-	8	8
субкардіальний	1	2	3
неуточнений	-	2	2
Шлунок	3 (75,0)	13 (43,3)	16 (47,1)
дно	-	2	2
тіло	-	6	6
антральний відділ	-	3	3
пілоричний відділ	-	-	-
неуточнений	3	6	9
Тип пухлини	-	8	8
інтестинальна дифузійна	1	6	7
персневидно-клітинний СА	-	4	4
змішаний	-	1	1
неуточнений	3	12	15
Гістопатологічна класифікація			
G2	-	10	10
G2-3	1	2	3
G3	1	14	15
G3-4	-	1	1
Невідома	2	3	5

На основі системно-органних класів (System Organ Class, SOC) Медичного словника регуляторної діяльності MedDRA найбільш частими клінічно значимими перенесеними захворюваннями були хірургічні процедури в 25 пацієнтів (73,5 %), хіміотерапія в 30 пацієнтів (88,2 %) і опромінення в 7 пацієнтів (79,4 %). У більшості випадків хірургічне втручання полягало в хірургічному видаленні органів (такому як гастроектомія (72 %), резекція стравоходу (16 %), висічення лімфатичних вузлів (32 %), холецистектомія (20 %)). Усі пацієнти, за виключення чотирьох, мали, щонайменше, одну попередню терапію їх захворювання згідно з дослідженням. На основі WHO DD ATC найчастіше використовували такі лікарські засоби як аналоги піримідину (фторурацил і/або капецитабін), сполуки платини (цисплатин і/або оксалиплатин) і детоксифікуючі агенти для протипухлинного лікування (фолінат кальцію й/або фолієва кислота). Інші попередні терапії (які припинялися саме пізніше в день інфузії) також були документально зафіксовані.

Усього 30 з 34 пацієнтів (88,2 %) мали, щонайменше, одне супутнє захворювання, тобто захворювання, яке тривало на день інфузії досліджуваного препарату. На основі MedDRA SOC найпоширенішими діагнозами були "порушення з боку шлунково-кишкового тракту" в 19 пацієнтів (56 %), "загальні порушення" в 12 пацієнтів (35 %), "порушення обміну речовин і харчування" в 10 пацієнтів (29 %) і "порушення з боку скелетно-м'язової й сполучної тканини" в 8 пацієнтів (23,5 %). Супутніми терапіями в основному були лікарські засоби проти кислотозалежних захворювань (17 пацієнтів; 50 %), болезаспокійливі засоби (12 пацієнтів; 35,3 %) і лікарські препарати для захворювань шлунково-кишкового тракту (10 пацієнтів; 29,4 %).

А. ОЦІНКА БЕЗПЕКИ

Оскільки ін'єкції досліджуваного препарату вводилися дослідниками в дослідних центрах і пацієнти повинні були залишатися в госпіталі для спостереження протягом 24 годин і аж до 72 годин, загальна прихильність до лікування відповідно з протоколом дослідження була гарантована. Розподіл включених у дослідження суб'єктів за дозовими когортами виконувалося, як зазначено в протоколі дослідження (під контролем DSMB). Тривалість дослідження, визначена як час від дати скринінгової частини 1 візиту до останнього дня дослідження змінювалася від мінімум 18 днів до максимум 355 днів. Середня тривалість дослідження становила 106 днів. 16 пацієнтів перервали дослідження передчасно перед цільовим візитом 9.

Пацієнти у всіх дозових групах одержували в середньому від 4,5 до 5 інфузій IMAV362. Середня тривалість однієї інфузії IMAV362 в АРТ-популяції склала 125 хвилин. Був один пацієнт із тривалістю інфузії менше 120 хвилин, зазначеною в протоколі. Цей пацієнт зупинив інфузію через блювоту й передчасно перервав дослідження.

Аналіз безпеки проводили для АРТ-популяції, яка включає 34 пацієнта, які одержували, щонайменше, одну дозу 300 мг/м² (n=4) або 600 мг/м² (n=30). Небажані явища в кількості, рівній двісті сорок одне (241), за описом терапевта були кодовані відповідно зі словником MedDRA і переведені в бажані терміни. Небажані явища відповідно до бажаних термінів підраховували тільки один раз для кожного пацієнта (також, якщо таке ж небажане явище виникало більше одного разу для цього пацієнта під час дослідження). Найвищий бал згідно NCI-CTC, який виникав в кожного пацієнта, записували. Тридцять два (32, 94 %) пацієнта мали, щонайменше, одне небажане явище (незалежно від взаємозв'язку) під час дослідження. Для 2 пацієнтів не було зафіксовано небажаних явищ. Усього 6 пацієнтів (18 %) не мали небажаних явищ, можливо пов'язаних з лікарським засобом. Сто чотири (104) пов'язаних з лікарським засобом небажаних явища за допомогою бажаних термінів повідомлялися для 28 пацієнтів. Вісім (8) можливо пов'язаних з лікарським засобом серйозних небажаних явища були зафіксовані для 4 пацієнтів. Кількість пацієнтів у дозовій групі з більш низькою дозою (300 мг/м²) була занадто малою для забезпечення ретельного порівняння між обома дозовими групами. Частота випадків пацієнтів з небажаними явищами, пов'язаними з лікарськими препаратами, у когорті 300 мг/м² і групі 600 мг/м² (когорта 2 і 3) склала 75 і 83 %, відповідно.

Усього згідно із системно-органними класами (SOC) найчастіше повідомлялося про такі небажані явища (АЕ) як "порушення з боку шлунково-кишкового тракту" (27/34 пацієнтів, 79,4 %), "загальні розлади й порушення в місці введення" (26/34 пацієнтів, 76,5 %). На основі MedDRA PT найчастіше повідомлюваними про такі небажані явища (АЕ), як "нудота" (57 явищ в 18 пацієнтів), "блювота" (52 явищ в 16 пацієнтів) і "стомлюваність" (20 явищ в 14 пацієнтів). Усього тільки 192 із зафіксованих небажаних явищ (АЕ) оцінювалося дослідниками як пов'язані з досліджуваним лікарським засобом. Ці пов'язані із проведеним лікуванням небажані явища (АЕ) були класифіковані в 104 різних бажаних термінах й спостерігалися в 28/34 пацієнтів.

Більшість пов'язаних із проведеним лікуванням небажаних явищ були від легких до

помірних. Було 8 (23,5 %) пацієнтів з помірними, пов'язаними з лікарським засобом небажаними явищами, які виникали під час лікування, і 12 (35,3 %) пацієнтів з важкими, пов'язаними з лікарським засобом небажаними явищами, що виникали під час лікування.

Пов'язані з лікарським засобом небажані явища (AE) сильної інтенсивності відзначалися в 2 пацієнтів у дозовій групі 300 мг/м², блювота й в одного пацієнта супутня нудота. У дозовій групі 600 мг/м² 10 пацієнтів страждали від важких небажаних явищ, пов'язаних з лікарським засобом, 6 пацієнтів від блювоти, з яких 3 пацієнти додатково страждали від нудоти, один пацієнт мав гіперчутливість (алергічну реакцію), один пацієнт із гіперсекрецією слини, один пацієнт зі зневодненням, і один пацієнт із гіпоальбумінемією. В останніх двох пацієнтів також відзначалася нудота й блювота. Два пацієнти страждали від пов'язаної з лікарським засобом гіперчутливості (алергічної реакції) під час інфузії лікарського засобу, одна з яких була класифікована як помірна або одна як важка. Обидва пацієнти відновилися після припинення інфузії.

У всіх відзначених небажаних явищах, які виникають у ході лікування, дія досліджуваного лікарського засобу для 12/34 пацієнтів було неминуче пов'язана з небажаним явищем. В 7 (21 %) випадках небажане явище призводило до тривалого переривання дослідження. Основне небажане явище було пов'язане з лікарським засобом в 3 (гіперчутливість (алергічна реакція) (n=2), блювота й біль у животі) і не пов'язане з лікарським засобом в інших чотирьох пацієнтів (погіршення загального стану здоров'я (n=3), пневмонія). В одного пацієнта доза була зменшена, а в іншого пацієнта введення дози було відкладене на 4 дні через серйозну блювоту з нудотою. У трьох пацієнтів інфузія була перервана/продовжена. Двадцять сім пацієнтів (79 %) одержували супутню терапію через небажане явище. Одинадцять пацієнтів були госпіталізовані.

В 13 пацієнтів було зафіксовано 31 серйозне небажане явище (SAE). Один пацієнт помер під час фази другого скринінга дослідження. Дванадцять пацієнтів мали інші серйозні небажані явища, які були пов'язані з досліджуваним лікарським засобом у чотирьох пацієнтів. Блювота, нудота й зв'язані небажані явища, такі як шлунково-кишкова (GI) кровотеча й ексікоз, були оцінені дослідниками як пов'язані з досліджуваним препаратом. У даному дослідженні були відзначені 4 SAR і 2 SUSAR (блювота й блювота з GI кровотечею). Кінцевим результатом була смерть у семи випадках. Жоден зі смертельних випадків не був класифікований дослідниками як пов'язаний з досліджуваним препаратом.

Один пацієнт чоловічої статі кавказоїдної раси у віці 45 років мав гарний загальний стан здоров'я (статус стану здоров'я згідно ECOG стадії 1, індекс Карновського 80 %) зі статусом дієти для зменшення ваги тіла (BMI 19.3).

Пацієнт одержував інфузії 300 мг/м² IMAB362 кожні два тижні, 04 листопада, 22 листопада й третю - 6 грудня 2011 року. До дослідження пацієнт уже страждав від нудоти й блювоти 1 ступеня. 7 листопада 2010 року була діагностована блювота 3 ступеня. Оскільки вона оцінювалася як серйозна, пацієнт був госпіталізований. Коли блювота змінилася на 1 ступінь 17 листопада 2010 року й у підсумку повністю припинилася, пацієнт у той же день був виписаний з госпіталю. Перед другою і третьою інфузією IMAB362 пацієнт одержував лікування сильними премедикаційними лікарськими засобами (алізаприд, апрепітант, метоклопрамід, димегідринат) як профілактику нудоти й блювоти, таким чином, він не страждав знову від нудоти й блювоти. Дослідник оцінив блювоту як пов'язану з досліджуваним лікарським засобом. Звіт був отриманий спонсором 19 січня 2011 року й серйозне небажане явище (SAE) оцінювалося як неочікувана, але пов'язане з досліджуваним лікарським засобом і, таким чином, зазначене як SUSAR.

Один пацієнт чоловічої статі кавказоїдної раси мав вік 77 років. Він мав дуже гарний загальний стан (загальний стан здоров'я згідно ECOG: стадія 0, індекс Карновського: 100 %) з нормальним статусом дієти (BMI 24) при скринінгу. Перед дослідженням пацієнт уже страждав від нудоти й тому одержував лікування в міру необхідності метоклопрамідом. Пацієнт одержав тільки одноразово 600 мг/м² IMAB362 9 листопада 2011 року, оскільки дослідження було перерване через смерть. Плевральний випіт у лівому легені було діагностовано за допомогою рентгенографії перед інфузією і описано як SAE. На наступний ранок почався гематемезис. Після введення пантопразолу й 8 мг ондансетрону, внутрішньовенно, блювота зменшилася, і гематемезис припинився в той же день. Блювота зменшилася з 3 ступеня до 2 ступеня й остаточно припинилася 12 листопада 2011 року, так що пацієнт був виписаний з госпіталю 13 листопада 2011 року. Дослідники оцінювали подію як пов'язану з досліджуваним лікарським засобом. Звіт був отриманий спонсором 10 листопада 2011 року, і подія розцінювалася як неочікувана, але пов'язана з досліджуваним лікарським засобом і тому було зазначена як SUSAR. Загальний стан пацієнта погіршився, у нього розвилася ниркова недостатність і, на жаль, він помер 6 грудня 2011 року.

Один пацієнт чоловічої статі кавказької національності у віці 42 років мав дуже гарний загальний стан (загальний стан здоров'я згідно ECOG: стадія 0, індекс Карновського: 100 %) зі статусом нормального харчування (BMI 26). Пацієнт одержав дві інфузії 600 мг/м² IMAV362. 20 березня 2012 року пацієнт одержав перше введення досліджуваного лікарського засобу. Оскільки він страждав від нудоти й серйозної блювоти, швидкість інфузії була зменшена через 35 хвилин після початку інфузії. Симптоми лікували за допомогою 40 мг пантопризолу й 3 мг гранісетрону, і 2 ампул внутрішньовенно бутилскополаміну, і 80 мг внутрішньовенно апропітанту. Це серйозне небажане явище привело до тривалої госпіталізації. Дослідник оцінив дане явище як пов'язане з досліджуваним лікарським засобом. Звіт про SAE був отриманий спонсором 21 березня 2012 року, і подія була оцінена як очікувана й пов'язана з досліджуваним лікарським засобом. Через кілька днів, 24 березня 2012 року пацієнт був госпіталізований знову через серйозне зневоднення, яке було викликано нудотою й блювотою. Крім того, пацієнт страждав від болю в стравоході. Він одержав 1 г внутрішньовенно метамізолу, бупренорфіновий пластрин і інфузії проти зневоднення. 30 березня 2012 року симптоми ослабнули й пацієнт регідратував. Дослідник оцінив дану подію як не пов'язану з досліджуваним лікарським засобом. Звіт про SAE був отриманий спонсором 26 березня 2012 року, і подія оцінювалася як неочікувана й не пов'язана з досліджуваним лікарським засобом. 3 квітня 2012 року пацієнт одержав другу інфузію, яка знову викликала небажані явища у вигляді нудоти й блювоти. Пацієнт одержав 30 капель перорально метоклопраміда й 1 ампулу внутрішньовенно дименгідранату. Оскільки симптоми погіршилися 5 квітня 2012 року, вони були оцінені як важкі. Крім того, пацієнт страждав на дисфагію, і тому сильно зменшився прийом їжі. 15 квітня 2012 року симптоми минули. Дослідник оцінив дану подію як пов'язану з досліджуваним лікарським засобом. Звіт про SAE був отриманий спонсором 19 квітня 2012 року, і подія оцінювалася як очікувана й пов'язана з досліджуваним лікарським засобом.

Один пацієнт чоловічої статі кавказької раси у віці 73 років мав гарний загальний стан (загальний стан здоров'я згідно ECOG: стадія 1, індекс Карновського: 90 %) зі статусом нормального харчування (BMI 26). З 8 листопада 2011 року по 3 січня 2012 року пацієнт одержував п'ять запланованих уведень досліджуваного лікарського засобу IMAV362 у дозі 600 мг/м² кожні два тижні. 8 листопада 2011 року пацієнт одержав перше введення IMAV362. Під час і після інфузії він страждав від нудоти й блювоти. Симптоми стали важкими 9 листопада 2011 року. Після лікування метоклопрамідом симптоми пройшли днем пізніше. Дослідник оцінив подію як пов'язану з досліджуваним лікарським засобом. Звіт про SAE був отриманий спонсором 10 листопада 2011 року, і подія оцінювалася як очікувана й пов'язана з досліджуваним лікарським засобом. 6 грудня 2011 року була проведена третя інфузія. Пацієнт страждав від легкої блювоти й помірної нудоти, одержував лікування клемастином, ранітидином і ондансетроном. Блювота тривала один день. Нудота тривала протягом 7 днів. Дослідження перервали 16 січня 2012 року внаслідок прогресування захворювання. Візит контрольного спостереження не проводили.

На закінчення було виявлено, що IMAV362 є безпечним і добре переноситься у популяції важких пацієнтів, які раніше проходили лікування, з аденокарциномою шлунка, стравоходу або гастроезофагеального з'єднання пізньої стадії. Загалом найбільш поширеними небажаними явищами (АЕ) згідно із системно-органими класами (SOC) були "порушення з боку шлунково-кишкового тракту" (27/34 пацієнтів, 79.4 %), "загальні розлади й порушення в місці введення" (26/34 пацієнтів, 76.5 %).

На основі MedDRA PT найбільш поширеними небажаними явищами (АЕ) були "нудота" (57 явищ в 18 пацієнтів), "блювота" (52 явища в 16 пацієнтів) і "стомлюваність" (20 явищ в 14 пацієнтів).

Усього 192 із зафіксованих небажаних явищ (АЕ) оцінювалися дослідниками як пов'язані з досліджуваним препаратом. Ці пов'язані із проведеним лікуванням небажані явища (АЕ) спостерігалися в 28 з 34 пацієнтів. Вісімдесят три (83) відсотка цих зв'язаних АЕ були порушеннями з боку шлунково-кишкового тракту (68 %, 130 АЕ), зафіксованими в 25 пацієнтів і загальними порушеннями (15 %, 29 АЕ), зафіксованими в 16 пацієнтів.

На основі MedDRA PT найбільш зв'язані із проведеним лікуванням небажані явища були від легких до помірних з нудотою (50 %), блювотою (47 %), стомлюваністю (27 %), болем у животі (15 %), периферійним набряком (15 %), зниженим апетитом (12 %) і діареєю (12 %), що виникає в більше 10 % пацієнтів.

Два пацієнти страждали від пов'язаної із проведеним лікуванням гіперчутливості (алергічної реакції) під час інфузії лікарського засобу, одна з яких була класифікована як помірна й одна як важка. Обидва пацієнти відновилися після припинення інфузії.

Пов'язаних з досліджуваним лікарським засобом лабораторних величин, які б відхилялися

від норми, СТС 4 ступеня (таких, що загрожують життю) або 5 (смерть) не відзначалося.

Було 12 (35,3 %) пацієнтів з небажаними явищами, які виникали під час лікування. Пов'язані з лікарським засобом небажані явища (АЕ) сильної інтенсивності відзначалися в 2 пацієнтів у дозовій групі 300 мг/м², блювота й в одного пацієнта супутня нудота. У дозовій групі 600 мг/м² 10 пацієнтів випробовували важкі пов'язані з лікарським засобом небажані явища, 6 пацієнтів із блювотою, з яких 3 пацієнта страждали додатково від нудоти, один пацієнт із гіперчутливістю (алергічна реакція), один пацієнт із гіперсекрецією слини, один пацієнт зі зневодненням і один пацієнт із гіпоальбумінемією. В останніх двох пацієнтів також відзначалася блювота й нудота.

На момент аналізу 13 пацієнтів відновилися від усіх пов'язаних з лікарським засобом небажаних явищ, 2 пацієнта перебували в стадії відновлення, 11 пацієнтів не відновилися, щонайменше, від одного небажаного явища (АЕ) і для 2 статус був невідомий. З 11 пацієнтів, у яких, щонайменше, одне пов'язане з лікарським засобом небажане явище не припинилося, 9 мали порушення з боку шлунково-кишкового тракту (4 нудота, 2 блювота).

В 13 пацієнтів було зафіксовано 31 небажане явище (АЕ), у тому числі 7 смертельних випадків. Один пацієнт вмер під час фази скринінга, тобто до початку інфузії досліджуваного лікарського засобу, і був, таким чином, класифікований як явище, зв'язане зі скринінгом (screening event). У чотирьох пацієнтів небажані явища, які виникали в ході лікування (SAE) з боку шлунково-кишкового тракту, такі як блювота (n=4), нудота (n=2), ексікоз (n=1) і шлунково-кишкова (GI) кровотеча (n=1) оцінювалися як пов'язані з лікуванням. Один із цих пацієнтів із блювотою одержував 300 мг/м², інші троє одержували 600 мг/м² IMAB362. Троє із цих чотирьох пацієнтів відновилися, за винятком одного, який вмер через ниркову недостатність, не пов'язану із проведеним лікуванням.

Частота виникнення небажаних явищ, пов'язаних з лікарським засобом, була співрозмірною між дозовими групами 300 мг/м² і 600 мг/м², і становила 75 % і 83 % пацієнтів, відповідно. Частота й сила нудоти, блювоти й стомлюваності також були співрозмірними між обома дозовими групами. Не існувало чіткому взаємозв'язку між дозою й частотою/тяжкістю небажаних явищ.

Профіль небажаних явищ із більшістю небажаних явищ (АЕ), які відмічались з боку шлунково-кишкового тракту, узгоджується з основним захворюванням, а також профілем експресії CLDN18.2. Передбачається, що нудота й блювота є цільовим ефектом (on-target effect), оскільки CLDN18.2 також експресується на клітинах епітелію шлунка (у щільних контактах).

У цілому, спостерігалось, що IMAB362, який вводиться у вигляді багаторазових доз, що становлять 300 мг/м² і 600 мг/м², є безпечним і добре переноситься, при цьому, блювота й нудота є найпоширенішими пов'язаними із проведеним лікуванням небажаними явищами.

В. ОЦІНКА ФАРМАКОКІНЕТИКИ Й ІМУНОГЕННОСТІ

Є попередні дані, що стосуються концентрації лікарського засобу для застосування багаторазових доз IMAB362 для чотирьох пацієнтів з першої й 34 пацієнтів із другої і третьої когорт, які одержували 300 мг/м² і 600 мг/м² IMAB362, відповідно.

Таблиця 11

C_{max} (максимальна концентрація лікарського засобу в сироватці крові) після першого й п'ятого введення IMAB362

Когорта/доза	Пацієнт	C_{max} після 1-ї інфузії [мкг/мл]	C_{max} після 5-ї інфузії [мкг/мл]
Когорта 1 [300 мг/м ²]	1001-01	349,6±179,2**	293,9±26,9
	1001-07	341,6±22,1	n.a. n.a.
	2002-02	253,3±7,1	326,5±3,6
	1001-10	208,9±3,2	259,1±8,2
Когорта 2 [600 мг/м ²]	1005-03	343,6±10,8	n.a. n.a.
	1005-04	256,9±5,7	n.a. n.a.
	1005-11	n.a. n.a.	n.a. n.a.
	1001-08	325,1±12,6	485,4±6,7
	2002-05	272,2±3,6	642,6±17,9
	2002-07	325,3±10,0	516,7±1,9

Таблиця 11

C_{\max} (максимальна концентрація лікарського засобу в сироватці крові) після першого й п'ятого введення IMAV362

Когорта/доза	Пацієнт	C_{\max} після 1-ї інфузії [мкг/мл]	C_{\max} після 5-ї інфузії [мкг/мл]
Когорта 3 [600 мг/м ²]	1011-05	296,1±13,7	385,8±15,1
	1013-02	310,9±4,7	428,0±17,9
	4001-11	323,4±8,9	n.a. n.a.
	1005-10	389,8±0,7	457,6±8,0
	1001-24	390,8±6,7	433,8±6,6
	1001-27	309,3±10,7	n.a. n.a.
	1003-10	300,7±2,1	n.a. n.a.
	1004-07	n.a. n.a.	n.a. n.a.
	1004-10	448,3±5,7	n.a. n.a.
	1004-11	n.a. n.a.	n.a. n.a.
	1005-18	269,2±6,7	n.a. n.a.
	1005-26	n.a. n.a.	n.a. n.a.
	1005-27	473,6±10,6	n.a. n.a.
	1005-29	280,2±16,7	n.a. n.a.
	1005-34	385,5±18,8	n.a. n.a.
	1006-03	317,0±14,8	278,1±8,9
	1006-05	276,0±18,2	n.a. n.a.
	1007-09	397,0±12,5	n.a. n.a.
	1011-09	411,1±12,1	535,9±17,0
	1011-16	322,5±8,5	314,5±15,6
	1011-17	462,3±10,6	n.a. n.a.
	1011-20	347,9±14,4	570,3±10,1
	1012-01	433,7±9,7	n.a. n.a.
	2003-08	575,1±30,7	n.a. n.a.
	2003-10	421,8±3,4	520,5±6,5
	2003-13	344,7±21,6	n.a. n.a.
	2003-15	380,9±3,1	n.a. n.a.
	2003-16	466,8±6,8	n.a. n.a.

**високий коефіцієнт варіації (CV) у результаті одного значення, що різко відхиляється, при вимірюванні в трьох повторностях

Зразки крові відбирали перед кожною інфузією. Після першої інфузії додаткові зразки відбирали наприкінці інфузії й через 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12, 24 години, 3 і 6 днів після завершення інфузії. Після останньої інфузії зразки відбирали наприкінці інфузії й через 1, 1.5, 2 години й 14 днів, а також через 4-8 тижнів після завершення останньої інфузії. Аналізованої речовини не було виявлено в зразках до введення доз від пацієнтів, розподілених у когорту 1-3.

Після першої інфузії IMAV362 значення C_{\max} перебували в інтервалі від 208,9 мкг/мл до 349,6 мкг/мл для першої когорти. Для другої і третьої когорти, узяті разом, значення C_{\max} перебували в інтервалі від 269,1 мкг/мл до 575,1 мкг/мл після першого застосування.

У зразках сироватки, узятих у наступні моменти часу (від V3 до V5), спостерігалось залежне від часу зниження концентрації IMAV362 (Фігура 8). Під час візиту 5 до другої інфузії мінімальні рівні в сироватці в діапазоні від 11,3 мкг/мл до 36,8 мкг/мл (середнє значення 22,5±10,5 мкг/мл) були визначено для когорти 1, і в діапазоні від 17,0 мкг/мл до 100,2 мкг/мл (середнє значення 54,5±29,0 мкг/мл) для взятих разом когорти 2 і 3.

Під час візиту 8 (день 57) до п'ятої інфузії мінімальні рівні в сироватці в діапазоні від 32,4 мкг/мл до 67,1 мкг/мл (середнє значення 46,1±18,5 мкг/мл) були визначено для когорти 1, і в діапазоні від 28,3 мкг/мл до 301,6 мкг/мл (середнє значення 147,2±93,1 мкг/мл) для когорти 2 і 3 (таблиця 12).

Після інфузії під час візиту 8, значення C_{\max} перебували в інтервалі від 259,1 мкг/мл до 326,5 мкг/мл для першої когорти, і в інтервалі від 278,1 мкг/мл до 642,6 мкг/мл для когорти 2 і 3 (таблиця 11).

Для когорти 1 середні значення C_{\max} були визначені через 90 хв. після першої інфузії ІМАВ362 ($270,6 \pm 63,9$ мкг/мл) і через 90 хв. після п'ятої інфузії ($279,2 \pm 27,7$). Для взятих разом когорт 2 і 3 середні значення C_{\max} були визначені наприкінці першої інфузії ІМАВ362 ($340,8 \pm 80,2$ мкг/мл) і через 60 хв. після п'ятої інфузії ($443,3 \pm 97,7$) (таблиця 12).

- 5 Таким чином, визначені рівні ІМАВ362 у сироватці крові показали, що в пацієнтів, які одержували лікування в дозі 300 мг/м^2 , концентрація ІМАВ362 у сироватці крові опускалася нижче бажаного рівня, що становить 50-100 мкг/мл у період між 2-х тижневими циклами. При дозі 600 мг/м^2 , навпаки, у більшості пацієнтів рівні ІМАВ362 у сироватці крові склали вище 50 мкг/мл навіть через 2 тижні після першого застосування. Через 7-29 днів (у середньому 15 днів)
- 10 після 5-го введення рівень дози склав вище 50 мкг/мл (середнє значення $151,3 \pm 90,1$ мкг/мл).

Таблиця 12

Описові дані фармакокінетичних параметрів при багаторазовім уведенні ІМАВ362 у дозі 300 мг/м^2 і 600 мг/м^2

Середня концентрація \pm стандартне відхилення (мкг/мл) ІМАВ362 у сироватці 4 пацієнтів, що одержували лікування багаторазовими дозами, що становлять 300 мг/м^2 (когорта 1), і до 30 пацієнтів (перша інфузія 30 пацієнтів, п'ята інфузія 12 пацієнтів), що одержували лікування багаторазовими дозами, які становлять 600 мг/м^2 (когорта 2 і когорта 3 разом)

Доза ІМАВ362	Концентрація (середнє \pm стандартне відхилення) ІМАВ362 [мкг/мл]	
	300 мг/м^2	600 мг/м^2
C_{\max} після 1 ^{ої} інфузії	$270,6 \pm 63,9$	$340,8 \pm 80,2$
Рівень до введення препарату перед 2 ^{ої} інфузією	$22,5 \pm 10,5$	$54,3 \pm 29,0$
Рівень до введення препарату перед 3 ^{ої} інфузією	$34,9 \pm 15,8$	$89,9 \pm 62,3$
Рівень до введення препарату перед 4 ^{ої} інфузією	$44,9 \pm 14,5$	$128,7 \pm 80,6$
Рівень до введення препарату перед 5 ^{ої} інфузією	$46,1 \pm 18,5$	$147,2 \pm 93,1$
C_{\max} після 5 ^{ої} інфузії	$279,2 \pm 27,7$	$443,3 \pm 97,7$
після 5 ^{го} введення	$34,5 \pm 12,2$	$151,3 \pm 90,1$

- Помірне накопичення ІМАВ362 спостерігалось від циклу до циклу. Коефіцієнт накопичення змінювався в діапазоні від 1,03-разового до 3,52-разового стосовно першого значення до введення дози перед другою інфузією (середнє значення 2,04).
- 15

Таблиця 13

Накопичення ІМАВ362 після багаторазових інфузій

Для визначення коефіцієнтів накопичення розраховували співвідношення концентрацій до візитів 6, 7, 8 і 9-х (лікування пацієнтів, що відповіли на лікування) і до другої інфузії (візит 5)

Когорта 3		До інфузії						
Коеф. на- копичення	Клон	V6/V5	V7/V5	V8/V5	V9.1/V5	V9.2/V5	V9.3/V5	V9.4/V5
Пацієнт 101105	F02	1,73	2,10	2,16				
Пацієнт 101302	F02	1,78	2,36	2,08	1,70	1,82	2,03	2,28
Пацієнт 400111	F02	2,04	2,44					
Пацієнт 100510	#15	1,83	2,41	2,24				
Пацієнт 100124	#15	2,33	2,69	2,42	1,98	3,17	2,54	1,49
Пацієнт 100410	#15	3,05						
Пацієнт 100529	F02	1,49	1,66					
Пацієнт 100603	F02	1,21	1,39	1,66	1,92	3,52		
Пацієнт 100605	F02	1,12	1,83					
Пацієнт 101109	#15	2,12	2,70	2,29				
Пацієнт 101120	#15	1,71	2,12	2,39				
Пацієнт 200310	#15							

На закінчення, було виявлено, що фармакокінетика ІМАВ362 є дозозалежною.

Після першої інфузії ІМАВ362 значення C_{\max} перебували в інтервалі від $208,9$ мкг/мл до

349,6 мкг/мл для першої когорти. Для другої і третьої когорт, узятих разом, значення C_{max} перебували в інтервалі від 269,1 мкг/мл до 575,1 мкг/мл після першого застосування.

У зразках сироватки, узятих у наступні моменти часу (від V3 до V5), спостерігалось залежне від часу зниження концентрації IMAV362. Під час візиту 5 до другої інфузії мінімальні рівні в сироватці в діапазоні від 11,3 мкг/мл до 36,8 мкг/мл (середнє значення $22,5 \pm 10,5$ мкг/мл) були визначені для когорти 1, і в діапазоні від 17,0 мкг/мл до 100,2 мкг/мл (середнє значення $54,5 \pm 29,0$ мкг/мл) для когорт 2 і 3, узятих разом.

Під час візиту 8 (день 57) до п'ятої інфузії мінімальні рівні в сироватці в діапазоні від 32,4 мкг/мл до 67,1 мкг/мл (середнє значення $46,1 \pm 18,5$ мкг/мл) були визначені для когорти 1, і в діапазоні від 28,3 мкг/мл до 301,6 мкг/мл (середнє значення $147,2 \pm 93,1$ мкг/мл) для когорт 2 і 3.

Після 5-ої інфузії під час візиту 8 значення C_{max} перебували в інтервалі від 259,1 мкг/мл до 326,5 мкг/мл для першої когорти, і в інтервалі від 278,1 мкг/мл до 642,6 мкг/мл для когорт 2 і 3.

Для когорти 1 середні значення C_{max} були визначені через 90 хв. після першої інфузії IMAV362 ($270,6 \pm 63,9$ мкг/мл) і через 90 хв. після п'ятої інфузії ($279,2 \pm 27,7$). Для взятих разом когорт 2 і 3 середні значення C_{max} були визначені наприкінці першої інфузії IMAV362 ($340,8 \pm 80,2$ мкг/мл) і через 60 хв. після п'ятої інфузії ($443,3 \pm 97,7$).

Таким чином, визначені рівні IMAV362 у сироватці крові показують, що в пацієнтів, які одержували лікування в дозі 300 мг/м^2 , концентрація IMAV362 у сироватці крові опускалася нижче бажаного рівня, який становить 50-100 мкг/мл у період між 2-х тижневими циклами. Напроти, при дозі 600 мг/м^2 у більшості пацієнтів рівні IMAV362 у сироватці крові склали вище 50 мкг/мл навіть через 2 тижні після першого застосування. Через 7-29 днів (середнє число днів дорівнює 15) після 5-го введення рівень дози склав вище 50 мкг/мл (середнє значення $151,3 \pm 90,1$ мкг/мл).

С. ОЦІНКА ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ

Повна вибірка пацієнтів для аналізу (Full analysis set, FAS):

Включені всі суб'єкти, які одержували досліджуваний препарат, щонайменше, одноразово, і для яких є дані щодо ефективності лікування.

На момент аналізу в дослідження було включено 50 пацієнтів при дозі 600 мг/м^2 . Дев'ять із них були включені недавно й додаткові дані на теперішній момент були відсутні з причин їх недавнього включення. Для десяти пацієнтів не проводилася друга візуалізація пухлини й ці пацієнти, таким чином, не були включені в FAS-вибірку. FAS-вибірка включає 31 пацієнта.

Середній вік склав 57 років у діапазоні від 35 до 77 років. Пацієнти FAS-вибірки мали середній індекс Карновського, рівний 90 % (у діапазоні 70-100 %). Більшість (81 %) пацієнтів раніше одержували терапію у вигляді, щонайменше, одного хіміотерапевтичного режиму. Шість (6) пацієнтів раніше не одержували хіміотерапевтичного режиму.

Таблиця 14

Докладна інформація з попередніх хіміотерапевтичним режимам лікування
в Fas-Вибірці (n=31)

	5-FU/ Капецитабін	Сполуки платини	Таксани	Епірубіцин	Іринотекан	mAB/ інші агенти
Номер пацієнта	25 (81 %)	23 (74 %)	14 (45 %)	8 (26 %)	8 (26 %)	6 (19 %)

Медіана числа попередніх хіміотерапевтичних режимів склала 2,0 (в інтервалі від 0 до 5). Хіміотерапевтичні режими для гастроентерогастрального рака в основному складаються з різних комбінацій похідного 5-FU, сполуки платини, таксанів, епірубіцину, іринотекану, трастузумабу для Her2/неу-позитивних пацієнтів та інших експериментальних агентів. В FAS-вибірці 81 % пацієнтів одержували, щонайменше, одноразово 5-FU або капецитабін, і 74 % одержували лікування сполукою платини, щонайменше, одноразово перед включенням у дослідження. Шість (6, 19 %) пацієнтів раніше одержували лікування трастузумабом або іншими експериментальними агентами. Шість (6, 19 %) пацієнтів також одержували променеву терапію до початку дослідження.

Внаслідок пізньої стадії захворювання пацієнти мали медіану метастатичних ділянок, рівну 2,0 (в інтервалі від 1,0 до 4,0). Найбільш значними є лімфатичні вузли (19 pts, 61 %); печінка (13 pts, 42 %); асцити (8 pts, 26 %) і черевна порожнина (7 pts, 23 %).

Загальна частота контролю захворювання склала 39 % (таблиця 15). Чотири пацієнти мали

часткову відповідь і 8 пацієнтів мали стабілізацію захворювання. Першу повторну оцінку для цих пацієнтів проводили в період між 8 і 11 тижнями після першої інфузії, за винятком двох пацієнтів, для яких перша повторна оцінка пухлини була проведена через 6 тижнів, відповідно.

Таблиця 15

Оцінка кращої відповіді відповідно до RECIST, FAS-вибірка

Найкраща відповідь	Кількість (n)	%
Часткова відповідь (PR)	4	13
Стабілізація захворювання (SD)	8	26
Прогресування захворювання (PD)	19	62
Усього	31	100

5

В 6 пацієнтів з 12 з контролем клінічного перебігу захворювання, щонайменше, один пухлинний маркер (CEA; CA19-9; CA125; CA15-3), який був підвищеним на момент початку дослідження, знизився на 35-76 % за період дослідження. У трьох пацієнтів усі пухлинні маркери були нижче граничного значення й для одного пацієнта результати щодо пухлинного маркера були відсутні.

10

Зокрема, в 4 пацієнтів із прогресуванням захворювання як кращою відповіддю також було зниження пухлинного маркера на 29-54 % у період дослідження.

15

Часткові відповіді були досягнуті через 2,3 місяці лікування (два пацієнти), 6,5 місяців (один пацієнт) і 4,8 місяців (один пацієнт) відповідно. Для одного пацієнта була підтверджена часткова відповідь (PR), яка тривала ще протягом 4,4 місяців, що призвело до виживання без прогресування захворювання (PFS), яке становило 9,2 місяців для цього пацієнта. Для інших трьох пацієнтів підтвердження були зроблені через 6 (один пацієнт) і 12 тижнів (два пацієнти), відповідно. Більш докладна інформація подана в таблиці 16.

Таблиця 16

Докладна оцінка FAS-вибірки для кожного пацієнта

n.a. - дані поки відсутні; n.d. - не піддаються виявленню. *- цензурировання, оскільки подія не мала місце до листопада 2012 року або на даний момент точна дата невідома. Крайній строк спостереження після закінчення дослідження використовували в кожному випадку. # - пухлинний маркер нижче граничного значення. Тому не був включений у текст.

N пацієнта	К-сть інф.	К-сть пред. T _x	К-сть уч. позначок	IHC		Статус при входж.	Краща відповідь		PFS [тижні]	OS [місяці]
				Max	Сер. к-сть клітин		RECIST (зміна)	Пухлинний маркер		
2002-05	17	0	2	3	87	n.a.	SD (n.d.)	CA125-59 % [#]	40	
1001-08	11	4	2	3	83	PD	SD (±0 %)	CA19-9-35 %	23	
1007-02	16	1	2	2	70	SD	PR (-51 %)	CA15 ₃ -65 % [#]	40	
4001-12	2	2	2	2	63	n.a.	SD (+18 %)	n.a.	6	6.41
1013-02	9	5	4	3	68	n.a.	SD (+5 %)	збільшення	18	
1011-09	5	0	3	3	67	PD	SD (-25 %)	CA125-25 %	10*	
1001-24	8	2	4	2	50	PD	SD (0 %)	збільшення	16*	5.61
1006-03	17	3	3	3	70	SD	PR (-34 %)	CA125-37 %	34*	
1007-09	11	1	2	3	73	SD	SD (n.a.)	CA15 ₃ -42 % [#]	23*	
2003-15	11	0	3	3	80	PD	PR (-35 %)	CA125-35 %	22*	
2003-16	11	1	4	2	90	PD	PR (-39 %)	CA19-9-76 % CA125-75 %	22*	
1005-34	5	4	3	2	50	SD	SD (+17 %)	CEA-35 %	11*	
2002-07	5	0	1	2	50	PD	PD (n.d.)	n.d.	11	
4001-09	5	0	1	2	40	PD	PD (+40 %)	збільшення	10	
1005-13	5	5	2	3	65	n.a.	PD (+63 %)	збільшення	10	
4001-01	5	2	3	2	60	PD	PD (+60 %)	n.d.	9	

Таблиця 16

Докладна оцінка FAS-вибірки для кожного пацієнта

n.a. - дані поки відсутні; n.d. - не піддаються виявленню. *- цензурировання, оскільки подія не мала місце до листопада 2012 року або на даний момент точна дата невідома. Крайній строк спостереження після закінчення дослідження використовували в кожному випадку. # - пухлинний маркер нижче граничного значення. Тому не був включений у текст.

N пацієнта	К-сть інф.	К-сть пред. T _x	К-сть уч. позначок	IHC		Статус при входж.	Краща відповідь		PFS [тижні]	OS [місяці]
				Max	Сер. к-сть клітин		RECIST (зміна)	Пухлинний маркер		
1004-10	3	1	4	2	83	SD	PD (+4 %)	збільшення	6	
1005-10	5	4	2	3	53	PD	PD (-2 %)	CA15_3-40 % CA125-54 %	10	
1004-11	5	1	3	2	40	n.a.	PD (+32 %)	CA19_9-32 %	10	4.3
4001-11	4	4	3	3	80	n.a.	PD (+6 %)	CA15_3-49 %	7	
1011-05	5	1	2	2	58	n.a.	PD (+72 %)	збільшення	10	
1009-01	4	1	1	3	63	SD	PD (+71 %)	збільшення	8	
1011-16	5	2	1	3	75	PD	PD (-26 %)	CEA-29 % CA15_3-28 %	9	3.8
1012-01	3	2	1	2	50	n.a.	PD (+12 %)	збільшення	7	
1005-18	3	3	3	3	60	PD	PD (+3 %)	збільшення	5	
2003-10	5	0	4	2	60	n.a.	PD (+8 %)	збільшення	10	
1011-20	5	2	1	3	48	n.a.	PD (+82 %)	збільшення	9	
1003-10	2	2	2	3	50	n.a.	PD (n.a.)	n.a.	4*	
1001-27	3	4	4	3	73	n.a.	PD (n.a.)	n.a.	5*	1.6
1006-05	5	3	3	3	60	n.a.	PD (+73 %)	збільшення	10*	4.3
1005-29	3	3	2	3	75	SD	PD (+3 %)	збільшення	7	

Середнє виживання без прогресування захворювання для пацієнтів в Fas-вибірці складало 10 тижнів (мінімум 4 тижня; максимум 40 тижнів). Через обмежену доступність подій медіана виживання без прогресування захворювання для пацієнтів із клінічною користю (PR+SD), показана на Фігурі 9, має граничну величину. Пацієнти без клінічної користі (PD) мали медіану виживання без прогресування захворювання, яка складала 9 тижнів (мінімум 4 тижні; максимум 11 тижнів) (Фігура 9).

Відмінності були відсутні між пацієнтами із клінічною користю (PR або SD як кращою відповіддю) або прогресуванням захворювання (PD як кращою відповіддю) відносно віку (середній вік 56 років проти 59 років), відсутності попереднього хіміотерапевтичного режиму (у середньому 1,9 проти 2,1), індексу Карновського (у середньому 89 % проти 88 %). Тільки кількість метастатичних ділянок була меншою в групі пацієнтів, що відповіли на лікування, із середнім значенням 1,9 у порівнянні з 2,3 у групі пацієнтів, що не відповіли на лікування. Відмінність не є статистично значимою.

Інтенсивність (середня й максимальна) IHC-фарбування була подібної між пацієнтами із клінічною користю й прогресуванням захворювання. Кількість пофарбованих клітин відрізнялася між обома групами. Максимальна кількість пофарбованих клітин і середня кількість пофарбованих клітин була вищою в пацієнтів із клінічною користю із середнім значенням 77 % проти 67 % і 71 % проти 60 %, відповідно.

Відмінності також спостерігалися відносно локалізації метастаз. У пацієнтів із клінічною користю частота плеврального випота (25 % проти 5 %), перитонеального карциноматоза (42 % проти 11 %) і асцитів (42 % проти 16 %) була вищою в порівнянні з пацієнтами із прогресуванням захворювання як кращою відповіддю. Присутність метастазів у печінці було значно нижчою (17 % проти 58 %) у пацієнтів із клінічною користю.

Вибірка пацієнтів, що виконали вимоги протоколу (PP):

PP-популяція включала всіх пацієнтів, які завершили розділ лікування (до візиту 9) без якого-небудь істотного відхилення від протоколу.

З 31 пацієнта в FAS-вибірці два пацієнти мали істотне порушення протоколу (цільове пухлинне вогнище відсутнє) і дев'ять пацієнтів не завершили протокол дослідження до візиту 9 і, таким чином, одержали менше 5 необхідних інфузій IMAB362. PP-вибірка включає 20 пацієнтів.

Середня віку становила 60 років у діапазоні від 35 до 77 років. Пацієнти PP-вибірки мали

середній індекс Карновського 90 % (у діапазоні 70-100 %). Більшість (80 %) пацієнтів раніше одержували лікування у вигляді, щонайменше, одного хіміотерапевтичного режиму. Чотири (4) пацієнта не одержували раніше хіміотерапевтичного режиму лікування.

Таблиця 17

Докладний опис попередніх хіміотерапевтичних режимів лікування в РР-вибірці (n=20)

	5-FU/ Капецитабін	Сполуки платини	Таксани	Епі-рубіцин	Ірино-текан	mAB/ інші агенти
Кількість пацієнтів	16 (80 %)	15 (75 %)	11 (55 %)	4 (20 %)	5 (25 %)	5 (25 %)

5

Середня числа попередніх хіміотерапевтичних режимів склала 2,0 (у діапазоні від 0 до 5). Хіміотерапевтичні режими для гастроезофагеального рака в основному складаються з різних комбінацій похідного 5-FU, сполуки платини, таксанів, епірубіцину, іринотекану, трастузумабу для Her2/neu-позитивних пацієнтів і інших експериментальних препаратів. У РР-вибірці 80 % пацієнтів одержували, щонайменше, одноразово 5-FU або капецитабін і 75 % одержували лікування сполукою платини, щонайменше, одноразово до включення в дослідження. П'ять (5, 25 %) пацієнтів одержували раніше терапію трастузумабом або іншими експериментальними агентами. Більш докладна інформація представлена в таблиці 17. П'ять (5, 25 %) пацієнтів одержували променеви терапію до початку дослідження.

10

Внаслідок пізньої стадії захворювання пацієнти мали медіану метастатичних ділянок, рівну 3,0 (в інтервалі від 1,0 до 4,0). Найбільш значимими були лімфатичні вузли (13 pts, 65 %); печінка (9 pts, 45 %); асцити (6 pts, 30 %) і легеня (5 pts, 25 %).

15

Загальна частота контролю захворювання склала 50 %. Чотири пацієнти мали підтверджену часткову відповідь і 6 стабілізацію захворювання. Першу повторну оцінку для цих пацієнтів проводили в період між 8 і 11 тижнями після першої інфузії, за винятком одного пацієнта, для якого першу повторну оцінку пухлини проводили через 6 тижнів, відповідно (таблиця 18).

20

Таблиця 18

Оцінка кращої відповіді відповідно до RECIST, РР-вибірка

Найкраща відповідь	Кількість (n)	%
Часткова відповідь (PR)	4	20
Стабілізація захворювання (SD)	6	30
Прогресування захворювання (PD)	10	50
Усього	20	100

В 6 пацієнтів з 10 з контролем розвитку клінічного захворювання, щонайменше, один пухлинний маркер (CEA; CA19-9; CA125; CA15-3), який був підвищений на момент початку дослідження, знизився на 35-76 % за період дослідження. У двох пацієнтів усі пухлинні маркери були нижче граничного значення й для одного пацієнта результати щодо пухлинного маркера були відсутні.

25

Примітно, що 3 пацієнта із прогресуванням захворювання як кращою відповіддю також мали зниження пухлинного маркера на 29-54 % за період дослідження.

30

Часткові відповіді були досягнуті через 2,3 місяці лікування (два пацієнти), 6,5 місяців (один пацієнт) і 4,8 місяців (один пацієнт), відповідно. Для одного пацієнта була підтверджена часткова відповідь (PR), яка тривала ще протягом 4,4 місяців, що привело до PFS 9,2 місяців для цього пацієнта. Для інших трьох пацієнтів підтвердження були зроблено через 6 (один пацієнт) і 12 тижнів (два пацієнти), відповідно. Більш докладну інформацію подано в таблиці 19.

35

Таблиця 19

Докладна оцінка РР-вибірки для кожного пацієнта

n.a. - дані поки відсутні; n.d. - не піддаються виявленню. *- цензурування, оскільки подія не мала місце до листопада 2012 року або на даний момент точна дата невідома. Крайній строк спостереження після закінчення дослідження використовували в кожному випадку. # - пухлинний маркер нижче граничного значення. Тому не був включений у текст

Номер пацієнта	К-сть інф.	К-сть попер. Тх	К-сть мет. діл.	IHC		Статус входження	Краща відповідь		PFS [тижні]	OS [місяці]
				Max	Сер. к-сть клітин		RECIST (зміна)	Пухлинний маркер		
1001-08	11	4	2	3	83	PD	SD (± 0 %)	CA19-9-35 %	23	
1007-02	16	1	2	2	70	SD	PR (-51 %)	CA15_3-65 % [#]	40	
1013-02	9	5	4	3	68	n.a	SD (+5 %)	збільшення	18	
1011-09	5	0	3	3	67	PD	SD (-25 %)	CA125-25 %	10*	
1001-24	8	2	4	2	50	PD	SD (± 0 %)	збільшення	16*	5.61
1006-03	17	3	3	3	70	SD	PR (-34 %)	CA125-37 %	34*	
1007-09	11	1	2	3	73	SD	SD (n.a.)	CA15_3-42 % [#] CA125-27 % [#]	23*	
2003-15	11	0	3	3	80	PD	PR (-35 %)	CA125-35 %	22*	
2003-16	11	1	4	2	90	PD	PR (-39 %)	CA19-9-76 % CA125-75 %	22*	
1005-34	5	4	3	2	50	SD	SD(+17 %)	CEA-35 % CA 125-11 %	11*	
4001-09	5	0	1	2	40	PD	PD (+40 %)	збільшення	10	
1005-13	5	5	2	3	65	n.a.	PD(+63 %)	збільшення	10	
4001-01	5	2	3	2	60	PD	PD(+60 %)	n.d.	9	
1005-10	5	4	2	3	53	PD	PD (-2 %)	CA15_3-40 % CA125-54 %	10	
1004-11	5	1	3	2	40	n.a.	PD(+32 %)	CA19_9-32 %	10	4.3
1011-05	5	1	2	2	58	n.a.	PD(+72 %)	збільшення	10	
1011-16	5	2	1	3	75	PD	PD(-26 %)	CEA-29 % CA15_3-28 %	9	3.8
2003-10	5	0	4	2	60	n.a.	PD (+8 %)	збільшення	10	
1011-20	5	2	1	3	48	n.a.	PD(+82 %)	збільшення	9	
1006-05	5	3	3	3	60	n.a.	PD(+73 %)	збільшення	10*	4.3

ⁱ Вимірювання виконували саме раннє через 4 тижні й кожні 3-12 тижнів після цього протягом дослідження

Середнє виживання без прогресування захворювання для пацієнтів у РР-вибірці склала 18 тижнів (мінімум 9 тижнів; максимум 40 тижнів). Внаслідок обмеженої доступності подій медіана виживання без прогресування захворювання для пацієнтів із клінічною користю (PR+SD), показана на Фігурі 10, має граничну величину. Пацієнти без клінічної користі (PD) мали медіану виживання без прогресування захворювання, складову 10 тижнів (мінімум 9 тижнів; максимум 10 тижнів) (Фігура 10).

Відмінностей між пацієнтами із клінічною користю (PR або SD як кращою відповіддю) або прогресуванням захворювання (PD як кращою відповіддю) були відсутні відносно віку (середній вік 57 проти 62 років), що передують хіміотерапевтичних режимів (у середньому 2,1 проти 2,0), індексу Карновського (у середньому 88 проти 88 %). Тільки кількість метастатичних ділянок була вищою в пацієнта із клінічною користю із середньою кількістю 3,0 у порівнянні з 2,2 у пацієнта без клінічної користі. Відмінність не є статистично значимим.

Інтенсивність (середня й максимальна) ІНС-фарбування була подібної між пацієнтами із клінічною користю й прогресуванням захворювання. Кількість пофарбованих клітин відрізнялася між обома групами. Максимальна кількість пофарбованих клітин і середня кількість

пофарбованих клітин була вищою в пацієнтів із клінічною користю з максимальним показником 76 % проти 66 % і середнім показником 70 % проти 66 %, відповідно.

Відмінності також спостерігалися відносно локалізації метастазів. У пацієнтів із клінічною користю частота плеврального випота (30 % проти 10 %), перитонеального карциноматоза (40 % проти 0 %) і асцитів (40 % проти 20 %) були вище в порівнянні з пацієнтами із прогресуванням захворювання як кращою відповіддю. Присутність метастазів у печінці була значно нижчою (20 % проти 70 %) у пацієнтів із клінічною користю.

На закінчення, статус пухлини (відповідно до RECIST) через 2 тижні після 5-й інфузії IMAB362 (V9) порівнювали зі статусом, визначеним на момент початку дослідження. Для 31 пацієнта (FAS) проводилося, щонайменше, одне стадіювання після початку дослідження. У дослідження були включені пацієнти із захворюванням на кінцевій стадії з медіаною попередніх хіміотерапій 2,0 і метастатичних ділянок 2,0.

Підтверджена часткова відповідь була встановлена в чотирьох пацієнтів, що привело до частоти загальної відповіді, що становить 13 %. У трьох з них на теперішній момент відповідь тривала, тому тривалість відповіді не може бути розрахована. Крім того, вісім пацієнтів мали стабілізацію захворювання, що привело до частоти загальної відповіді, що становить 39 %. На момент проведення аналізу виживання без прогресування захворювання для цих 12 пацієнтів із клінічною користю становила в межах від 6 до 40 тижнів. Медіана не може бути розрахована, оскільки подія не була записана для 7 із цих пацієнтів на теперішній момент. В 9 пацієнтів із клінічною користю, щонайменше, один пухлинний маркер був підвищений на момент початку дослідження й знизився на -35-76 % в 6 з них одночасно. Зокрема 4 пацієнта із прогресуванням захворювання як кращою відповіддю також мали зниження на -29-54 %, щонайменше, одного з підвищених пухлинних маркерів за період дослідження. Загальна медіана виживання без прогресування захворювання склала 10 тижнів в інтервалі від 4 до ~40 тижнів.

У пацієнтів із клінічною користю (4 PR+8 SD=39 %) частота виникнення перитонеального карциноматоза, плеврального випота й асцитів була вищою, і частота виникнення метастазів у печінці була нижчою, ніж у пацієнтів без клінічної користі. З іншого боку, один пацієнт із підтвердженою частковою відповіддю мав часті метастази в печінці.

Виходячи з поточного набору даних можна припустити, що пацієнти із клінічною користю мали більш високе число клітин з ІНС-позитивним фарбуванням.

Крім того, додаткові дані, зібрані в обраних пацієнтів, показали, що компоненти сироватки крові пацієнтів і РВМС пацієнтів є повністю функціональними й активними відносно опосередкування основних механізмів дії IMAB362 CDC і ADCC, відповідно.

На закінчення, спостерігається протипухлинна активність (часткова відповідь, стабілізація захворювання, зниження пухлинного маркера), і IMAB362 заслуговує подальшого дослідження.

D. ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Дане дослідження розроблене як фаза ІІа мультицентрового, нерандомізованого, з ескалацією багаторазових доз у різних пацієнтів, відкритого клінічного дослідження з використанням 3 когорт. Для даного клінічного дослідження відбиралися пацієнти, які були рефракторними до стандартного лікування або для яких схвалена терапія була відсутня.

Для цього проміжного звіту 34 пацієнта підлягали оцінці в аналізі на безпеку (APТ-вибірка), з яких 4 було включено в когорту 1 (300 мг/м²), 6 у когорту 2 (600 мг/м²) і 20 у когорту 3 (600 мг/м²). IMAB362, що вводиться за схемою багаторазового дозування, був безпечним і добре переносився пацієнтами з гастроезофагеальним раком, які раніше одержували інтенсивне лікування, при цьому нудота й блювота були найпоширенішими, пов'язаними із проведенням лікування, небажаними явищами. Більшість небажаних явищ були від легких до помірних. Були тільки два пацієнти з алергійними реакціями, одна помірного ступеня, одна важкого. Ступінь 4 і ступінь 5 небажаних явищ були відсутні (включаючи лабораторні параметри) на цій фазі ІІа дослідження й попередній фазі І дослідження. Те, що IMAB362 дотепер не викликав небажаних явищ 4 ступеня, є дивним, оскільки більшість зареєстрованих моноклональних антитіл асоційовані із небажаними явищами ступеню 4 і 5, які загрожують життю. Показання до застосування бевацизумабу для лікування метастатичного раку молочної залози було анульовано FDA у листопаді 2011 року після попереднього первинного схвалення в 2008 році. Бевацизумаб не продовжував життя й викликав серйозний високий кров'яний тиск і крововилив з перфорацією стінки кишечника й перфорацією носової перегородки. Цетуксимаб викликає подібні до вугрового висипання й інфузійні реакції 3-4 ступеня, анафілаксію й зупинку серця, необхідність антигістамінної профілактики дифенгідраміном перед лікуванням. Трастузумаб усе ще широко застосовується, хоча викликає симптоматичну серцеву дисфункцію в 2-7 % пацієнтів, про що відомо протягом більше 10 років.

Первинним критерієм для оцінки потенційної протипухлинної активності був статус пухлини

відповідно до RECIST. Були пацієнти в кількості 31 людини, які мали, щонайменше, одну таку оцінку після включення в дослідження й, таким чином, були включені в FAS. Чотири PR і 8 SD в 31 (RR 13 %, DCR 39 %) пацієнта, який раніше пройшов інтенсивне лікування дуже добре узгоджуються з результатами відповідей, отриманими в інших дослідженнях фази II з використанням затвердженої таргетної монотерапії як терапії вторинного захворювання або захворювання на пізній стадії.

Цетуксимаб, антагоніст EGFR, досягав частоти об'єктивної відповіді (Response Rate, RR), що становить 3 % (з додатковими 7 % SD) на пізній стадії гастроезофагеального рака (GEC) (більшість пацієнтів мали 2 або більше метастатичних ділянок і попередні терапії), визначеної через 8 тижнів на фазі II дослідження за участю тридцяти пацієнтів. У другому дослідженні за участю 55 пацієнтів на пізній стадії цетуксимаб привів до 5 % RR і додатково 11 % SD, визначеним через 8 тижнів. Подібні показники частоти відповіді були досягнуті в EGFR-позитивних рефракторних пацієнтів з метастатичним колоректальним раком (mCRC), для терапії якого пізніше був схвалений цетуксимаб.

Сунітиніб і ерлотиніб тестували для пацієнтів з гастроезофагеальним раком (GEC) пізньої стадії в різних дослідженнях фази II за участю всього 150 пацієнтів. Частота контролю захворювання (DCR) через 6-8 тижнів варіювала між 16 і 39 %, і частота об'єктивної відповіді перебувала в діапазоні від 3 до 7 %, відповідно.

Частота об'єктивних відповідей на фазі II для трастузумаба як додаткової терапії рака молочної залози склала 11 % з додатковими 9 % SD ≥ 6 місяців. Для ерлотинібу у випадку раку легенів, який раніше піддавався лікуванню, відзначалася частота об'єктивної відповіді, яка складала 9 %. Сорафеніб досягав частоти об'єктивної відповіді (RR) від 2 % до 18 % у двох дослідженнях фази II у випадку раку нирки, і для темсиrolимуса частота об'єктивної відповіді (RR) склала 7 % при дослідженні раку нирки. Пізніше ці сполуки таргетної терапії були додатково розроблені в комбінації з хіміотерапією й стали зареєстрованими для цих застосувань.

IMAB362 є безпечним й ефективним антитілом. Як передбачалося виходячи із чудової тканинної специфічності цільової поверхневої молекули й зв'язування антитіла з високою точністю, експериментальний лікарський засіб гарно переноситься в порівнянні з іншими присутніми на ринку таргетними терапіями. Крім того, у декількох пацієнтів спостерігалися ознаки клінічної активності, яка співрозмірна або переважає результати фази II досліджень інших, уже присутніх на ринку таргетних терапій.

Приклад 5. Нудота/блювота, спричинена IMAB362

Спостерігалось, що IMAB362 викликає нудоту/блювоту аж до ступеня 3 NCI-CTC. Симптоматику можна описати в такий спосіб: (i) не залежить від дози, (ii) гострий початок, в основному протягом перших хвилин інфузії, може тривати після завершення інфузії, (iii) починається зі спазмів в епігастральній області, гіперсалівації, (iv) блювота може починатися без попередніх проявів, (v) рідко виникає в пацієнтів з тотальною гастректомією, (vi) реакція при першій інфузії є показником збільшення симптомів від циклу до циклу.

Той факт, що ці небажані реакції рідко виникають у пацієнтів, які були піддані тотальній гастректомії, дає підставу припускати, що механізм, який лежить в її основі є цільовим ефектом. Блювота, викликана IMAB362, виникає частіше, ніж нудота та її виникнення часте відзначається без попередньої нудоти. Початок може бути як гострим, так і відтермінованим. Передбачається, що незначні кількості IMAB362 зв'язуються з обмежено доступним епітопом щільних контактів. Це приводить до локального розриву щільних контактів і просочуванню шлункової кислоти в підслизистий шар. Реакції тканин і спазми, які виникають в результаті, ініціюють каскад нудоти/блювоти.

Таким чином, рекомендованими заходами протидії є ефективна протиблювотна профілактика й захист слизової оболонки шлунка.

Наприклад, пацієнти повинні одержувати протиблювотну профілактику до початку прийому препарату. Для профілактичних і лікувальних заходів рекомендована комбінація рецептора NK-1 (наприклад, апрепітант/еменд) і блокатора 5-HT₃-рецептора (наприклад, ондансетрон/зофран), яка може бути розширена додатковими сполуками. Прийом протиблювотного препарату бажано здійснюють протягом, щонайменше, перших трьох днів кожного циклу. Може бути розглянуте профілактичне введення бутилскополаміну/бускопану незадовго до кожної інфузії IMAB362.

Будь-який захід для захисту слизової оболонки може зменшити симптоми з боку шлунка. Щодо цього можна застосовувати інгібітори протонного насоса й/або мізопростол, які можна вводити, наприклад, на дні 1-2 або 3 кожного циклу. Нестероїдні протизапальні лікарські засоби (NSAID) застосовувати не слід, але застосування ацетаминофену допускається. Якщо

ацетамінофен є не ефективним у керуванні болем, можна застосовувати NSAID, якщо для керування болем потрібно уникнути терапії опіоїдами. Пацієнти, які одержують NSAID, бажано одержують лікування інгібіторами протонного насоса й/або мізопростолом.

Таким чином, протиблювотну профілактику й захист слизової оболонки шлунка можна починати незадовго до інфузії ІМАВ362. Наприклад, можна вводити наступну комбінацію, при цьому внутрішньовенне введення є бажаним:

- NK-1 RA: наприклад, апрепітант/еменд (150 мг IV)

- 5-HT₃ RA: наприклад, палонсетрон (0,25 мг IV), ондансетрон/зофран (8 мг IV), гранісетрон (3 мг IV)

- бутилскополамін/бускопан

- інгібітор протонного насоса: пантопразол/пантозол

Необов'язково, можна також вводити метоклопрамід/MCP, лоразепам і/або атропін.

ІМАВ362 є антитілом, в основі якого лежать імунологічні механізми дії, які можуть бути порушені імуносупресорними сполуками. Із цієї причини в протиблювотній профілактиці слід уникати застосування стероїдів і застосовувати їх тільки у випадку, якщо інші сполуки виявилися неефективними.

Крім того, необхідно уважно відноситися до застосування ІМАВ362. Наприклад, рекомендується ретельний контроль протягом перших 15-30 хв. За необхідності швидкість інфузії повинна бути знижена (наприклад, до 4 год. замість 2 год.) і повинні бути включені перерви в інфузії.

Прийом протиблювотних лікарських засобів, а також захист слизової оболонки шлунка можна продовжувати, наприклад, до 3 дня кожного циклу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування ракового захворювання у пацієнта, уникаючи несприятливих явищ ступенів 4 і 5, який передбачає введення пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN18.2, у дозі від 300 мг/м² до 1000 мг/м², у якому антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рівень у сироватці забезпечений у діапазоні від 40 мкг/мл до 700 мкг/мл.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що рівень у сироватці забезпечений протягом періоду, який складає щонайменше 7 днів.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що щонайменше 50 % ракових клітин пацієнта є CLDN18.2-позитивними й/або щонайменше 40 % ракових клітин пацієнта є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що антитіло вводять у вигляді одноразової дози або багаторазових доз.

6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що антитіло вводять у вигляді щонайменше 3 доз.

7. Спосіб за будь-яким з пп. 5 або 6, який **відрізняється** тим, що дози антитіла вводять із інтервалами щонайменше 7 днів.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що додатково передбачає введення одного або декількох препаратів, вибраних із групи, яка складається із протиблювотних засобів, антиспазматичних засіб, парасимпатолітичних речовин і агентів, які захищають слизову оболонку шлунка.

9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що передбачає введення пацієнтові антагоніста рецептора нейрокініну 1 (NK), такого як апрепітант (наприклад, еменд), антагоніста рецептора 5-HT₃, такого як ондансетрон (наприклад, зофран), гранісетрон (наприклад, кітрил, санкузо) або палонсетрон (наприклад, адокси), або комбінації двох або більше із них, антиспазматичного засобу, такого як бутилскополамін (наприклад, бускопан), та інгібітору протонного насоса, такого як пантопразол (наприклад, пантозол).

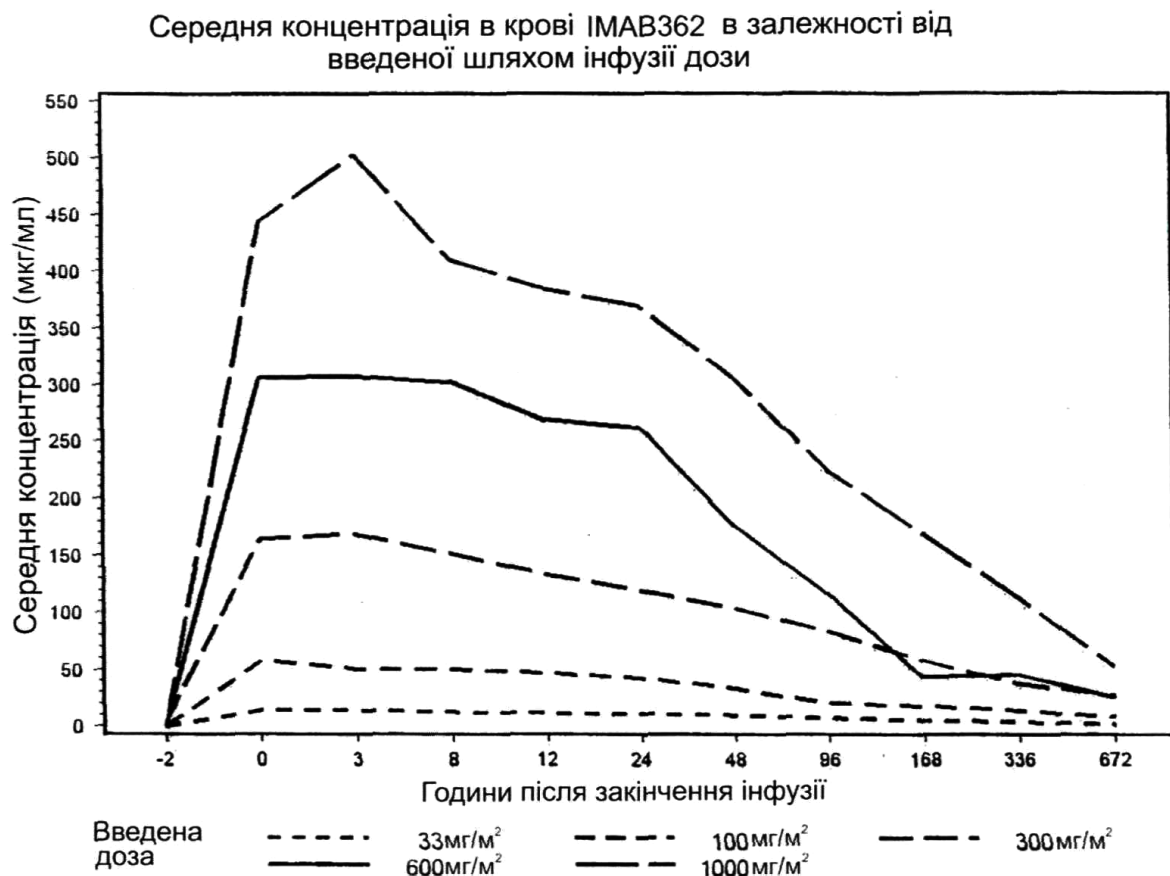
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що антитіло вводять шляхом внутрішньовенної інфузії.

11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що внутрішньовенну інфузію проводять протягом періоду часу, який становить від 1 до 4 годин.

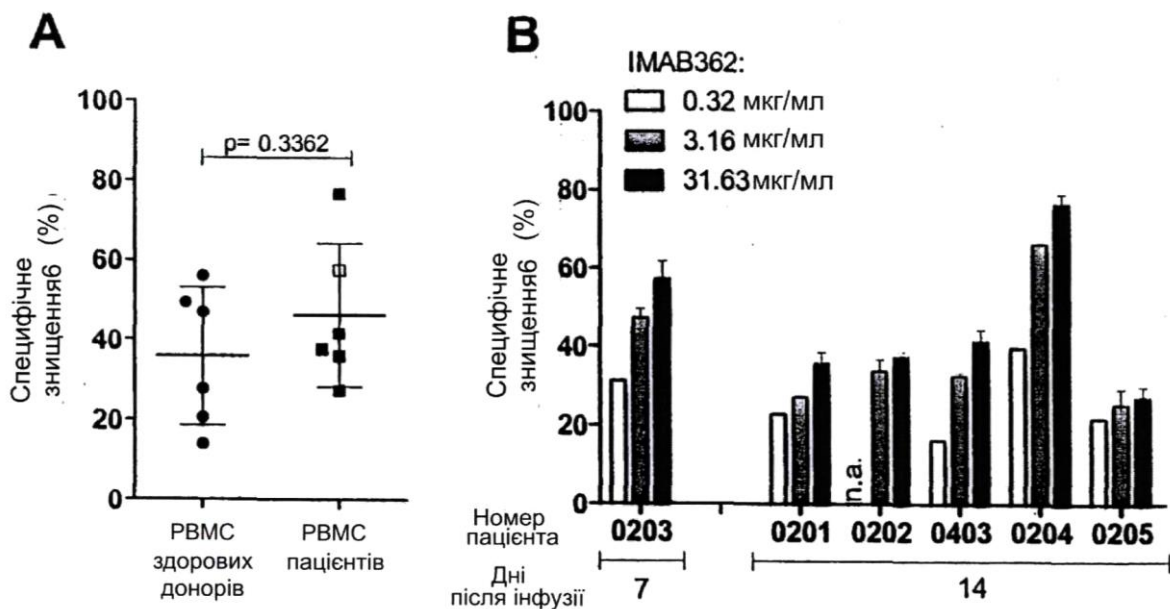
12. Спосіб визначення відповіді ракового пацієнта на лікування ракового захворювання, який передбачає введення антитіла, яке зв'язується з CLDN18.2 у способі лікування за будь-яким з пп. 1-11, при цьому зазначений спосіб передбачає стадію визначення рівня в крові в пацієнта одного або більше маркерів, який **відрізняється** тим, що один або більше маркерів вибрані із

групи, яка складається із CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IL-6, IFN γ і TNF α , і це антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24.

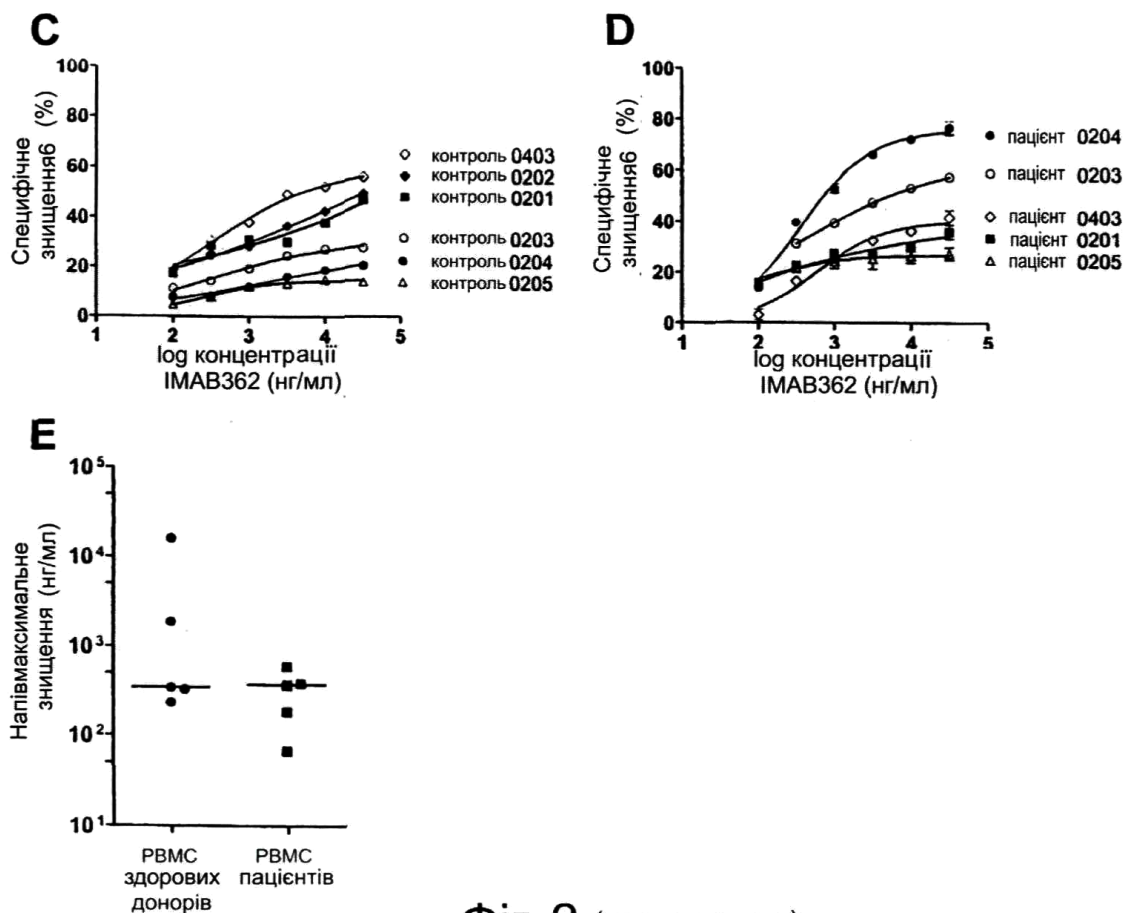
13. Спосіб за п. 12, який **відрізняється** тим, що рівень визначається в крові, плазмі або сироватці.
14. Спосіб за п. 12 або 13, який **відрізняється** тим, що один або більше маркерів обрані із групи, яка складається із CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IFN γ і TNF α , і зниження рівня щонайменше одного з маркерів після введення антитіла вказує на те, що пацієнт сприйнятливий до лікування або попередження ракового захворювання.
15. Спосіб за п. 12 або 13, який **відрізняється** тим, що маркер є IL-6 і підвищення рівня маркера після введення антитіла вказує на те, що пацієнт відповідає на лікування або попередження ракового захворювання.
16. Спосіб визначення сприйнятливості ракового пацієнта на лікування ракового захворювання, який передбачає введення антитіла, яке зв'язується з CLDN18.2, у способі лікування за будь-яким з пп. 1-11, при цьому зазначений спосіб передбачає стадію визначення процентного вмісту CLDN18.2-позитивних ракових клітин, і в якому це антитіло містить важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, і легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24.
17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що рівень, що становить щонайменше 50 % CLDN18.2-позитивних клітин, вказує на те, що пацієнт сприйнятливий до лікування ракового захворювання.
18. Спосіб за п. 16 або 17, який **відрізняється** тим, що рівень, який становить щонайменше 50 % ракових клітин, які є позитивними щодо поверхневої експресії CLDN18.2, вказує на те, що пацієнт сприйнятливий до лікування або попередження ракового захворювання.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, який **відрізняється** тим, що антитіло опосередковує знищення клітин за допомогою одного або декількох шляхів, вибраних з поміж лізису, опосередкованого комплемент-залежною цитотоксичністю (CDC), лізису, опосередкованого залежною від антитіла клітинною цитотоксичністю (ADCC), індукції апоптозу й інгібування проліферації.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що рак є гастроезофагеальним раком.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що рак є метастатичним рефракторним або рецидивуючим гастроезофагеальним раком пізньої стадії.
22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що раніше пацієнт одержував терапію щонайменше одним лікарським засобом, вибраним із групи, яка складається з аналогів піримідину, сполук платини, епірубіцину, доцетакселу й детоксифікуючих агентів для протипухлинного лікування.
23. Спосіб за будь-яким з пп. 1-22, який **відрізняється** тим, що пацієнт має статус загального стану за ECOG від 0 до 1 і/або індекс Карновського від 70 до 100 %.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-23, який **відрізняється** тим, що пацієнтом є людина.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-24, який **відрізняється** тим, що CLDN18.2 містить амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO:1.



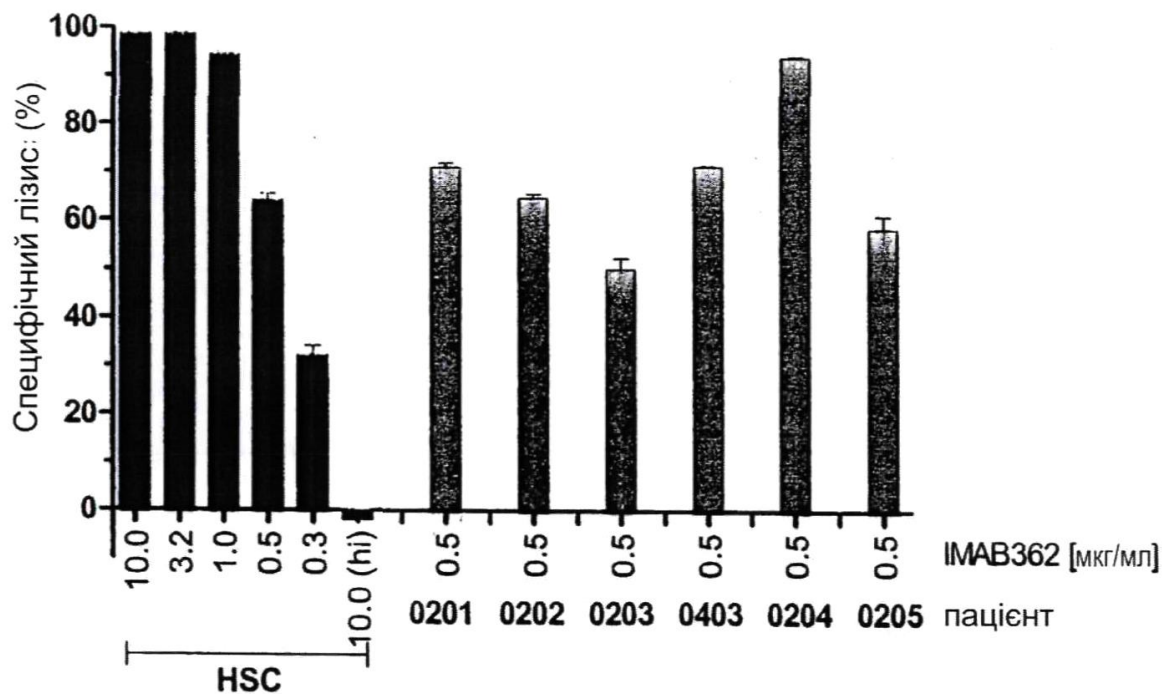
Фіг. 1



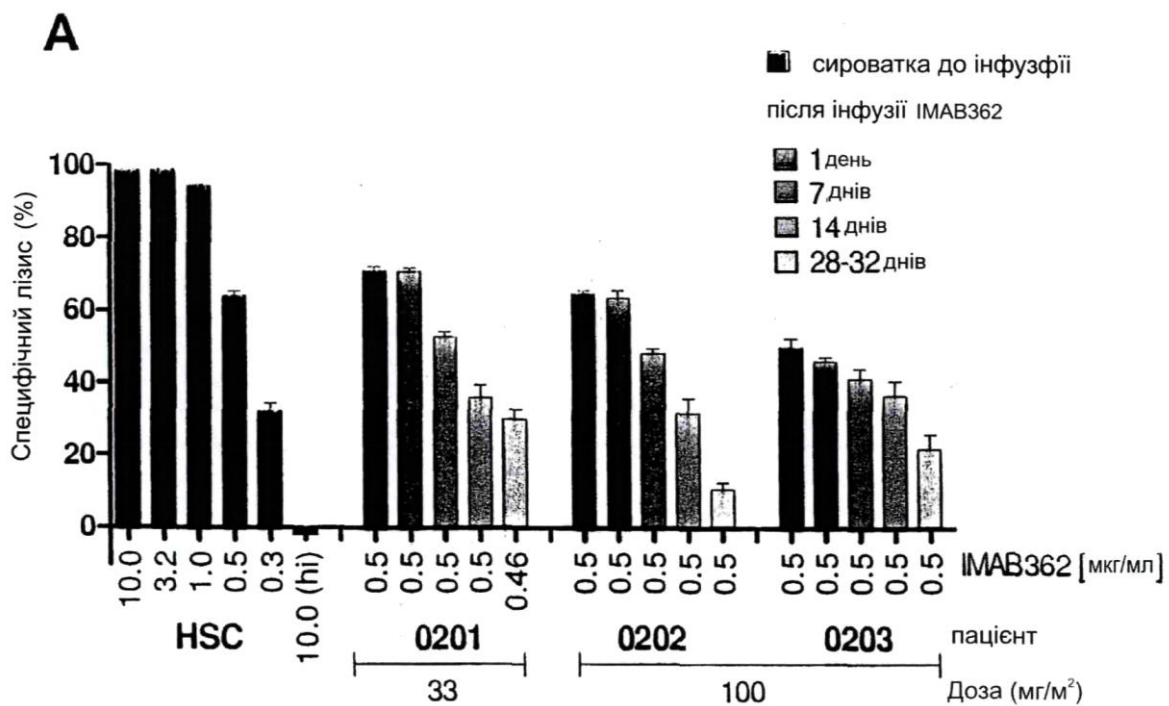
Фіг. 2



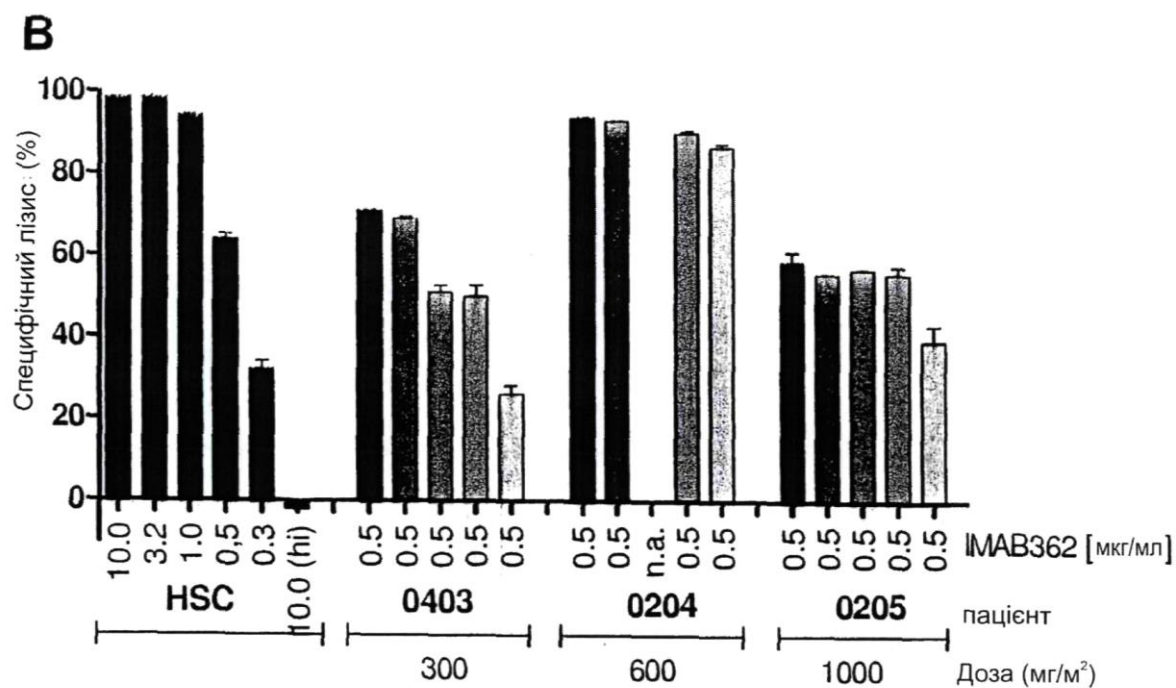
Фіг. 2 (продовження)



Фіг. 3

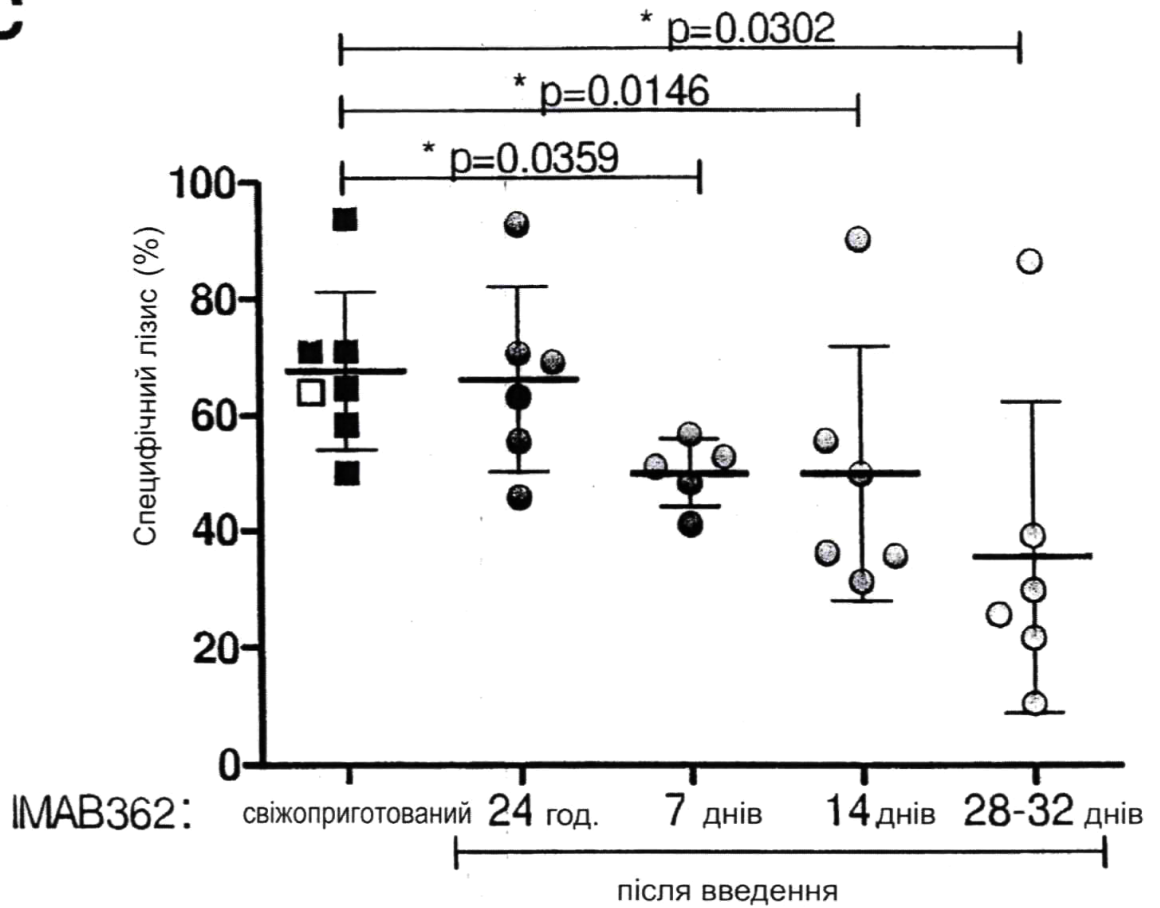


Фіг. 4

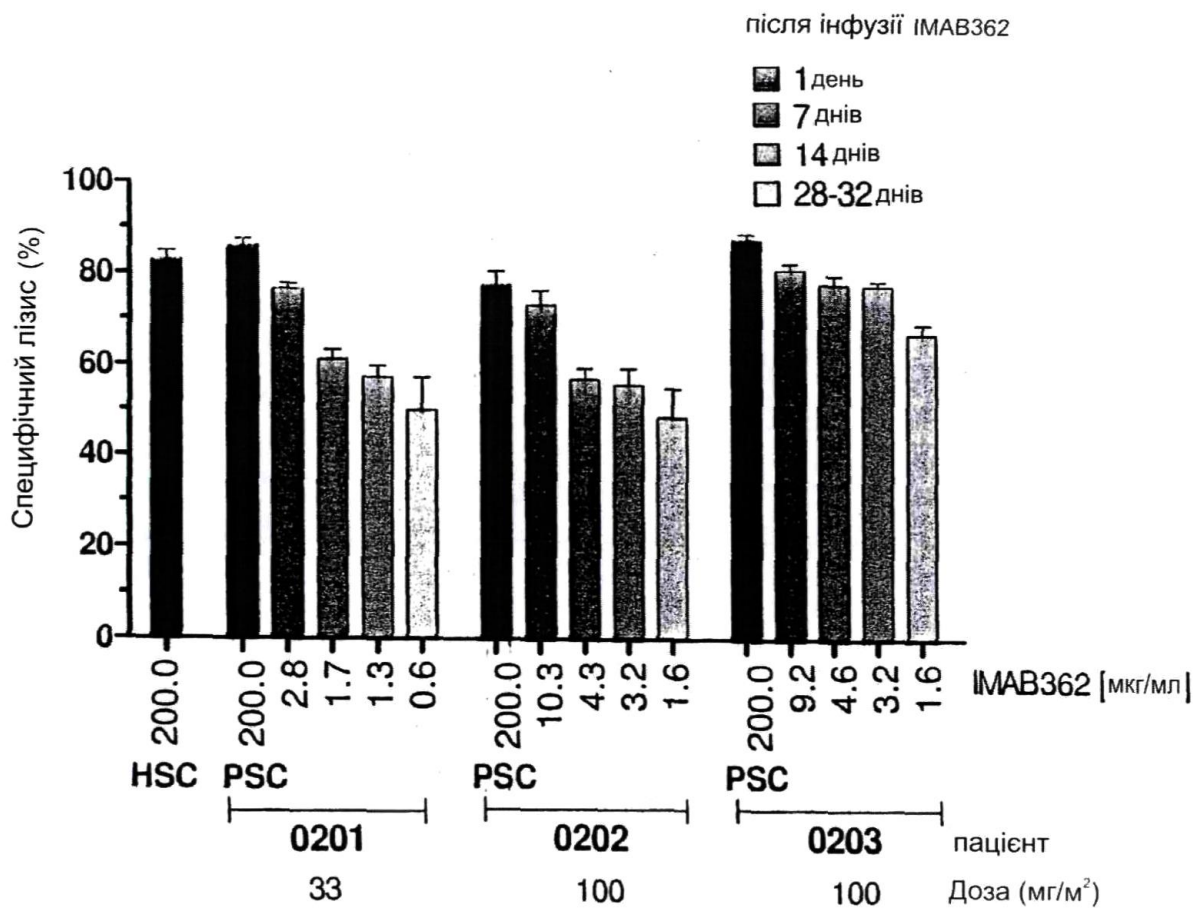


Фіг. 4 (продовження)

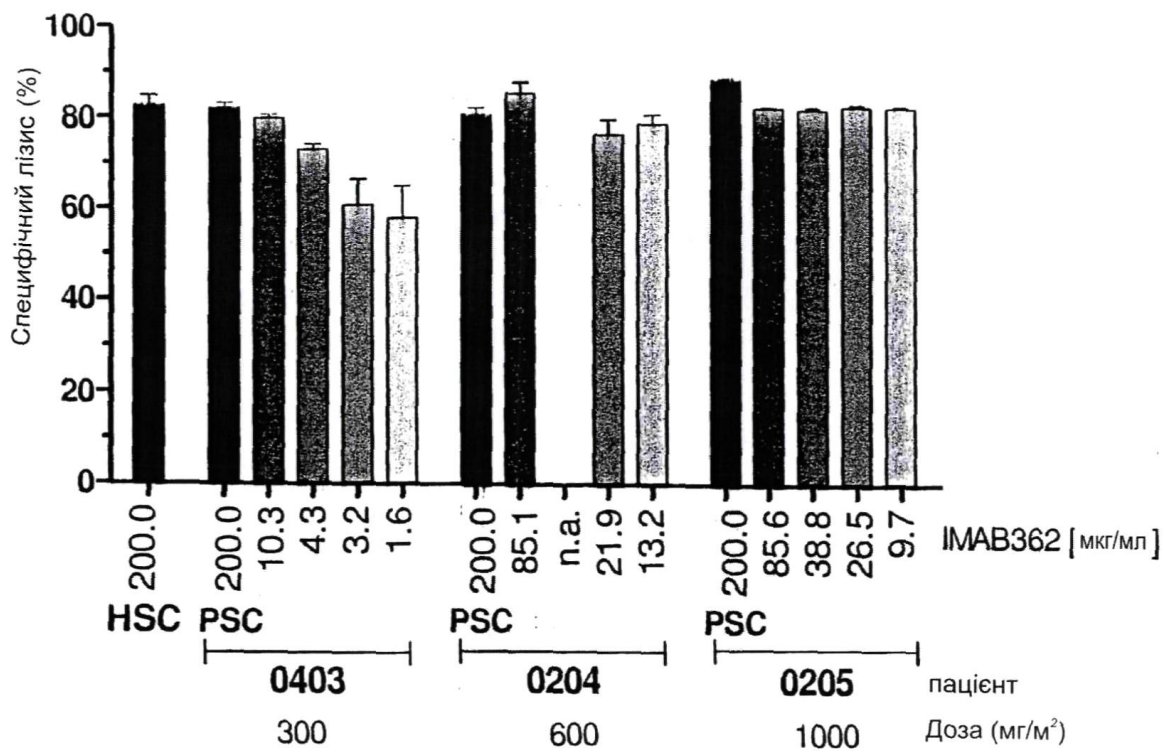
C



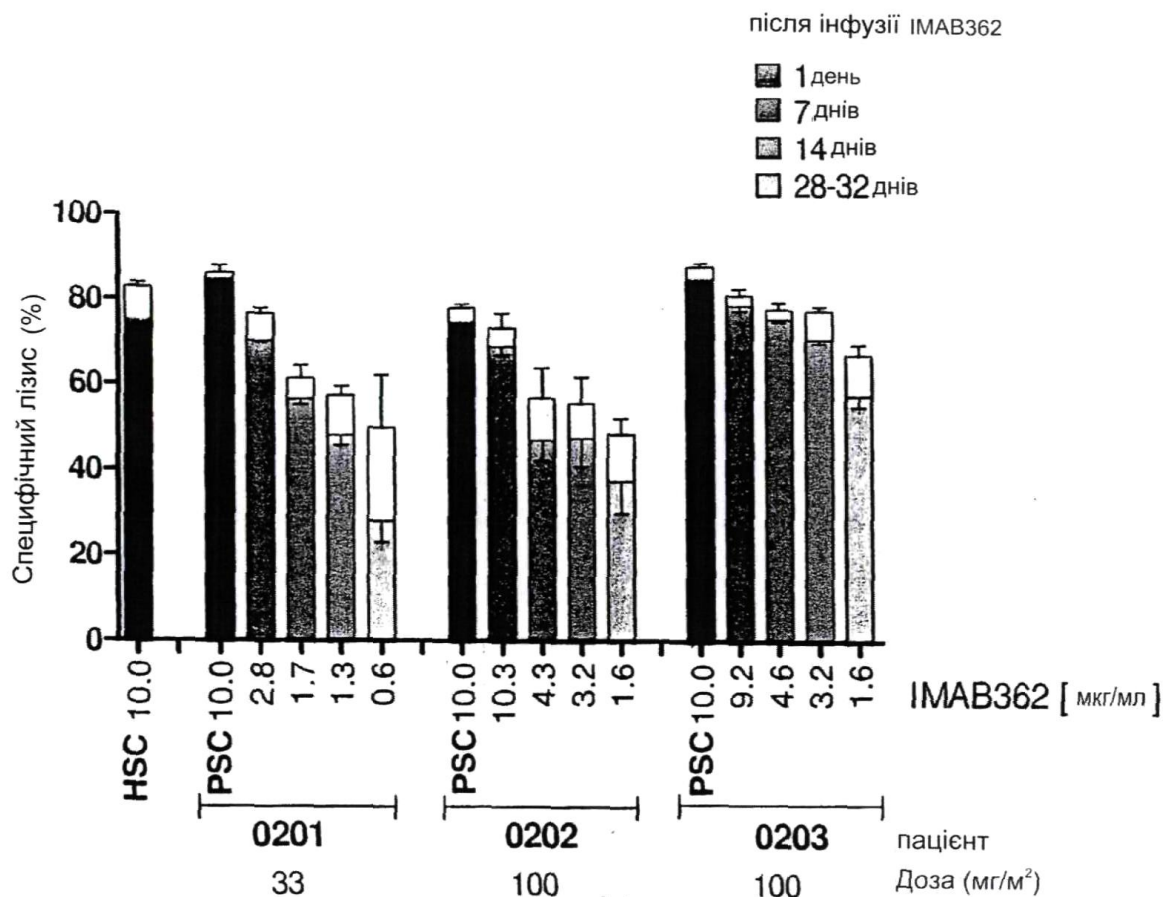
Фіг. 4 (продовження)



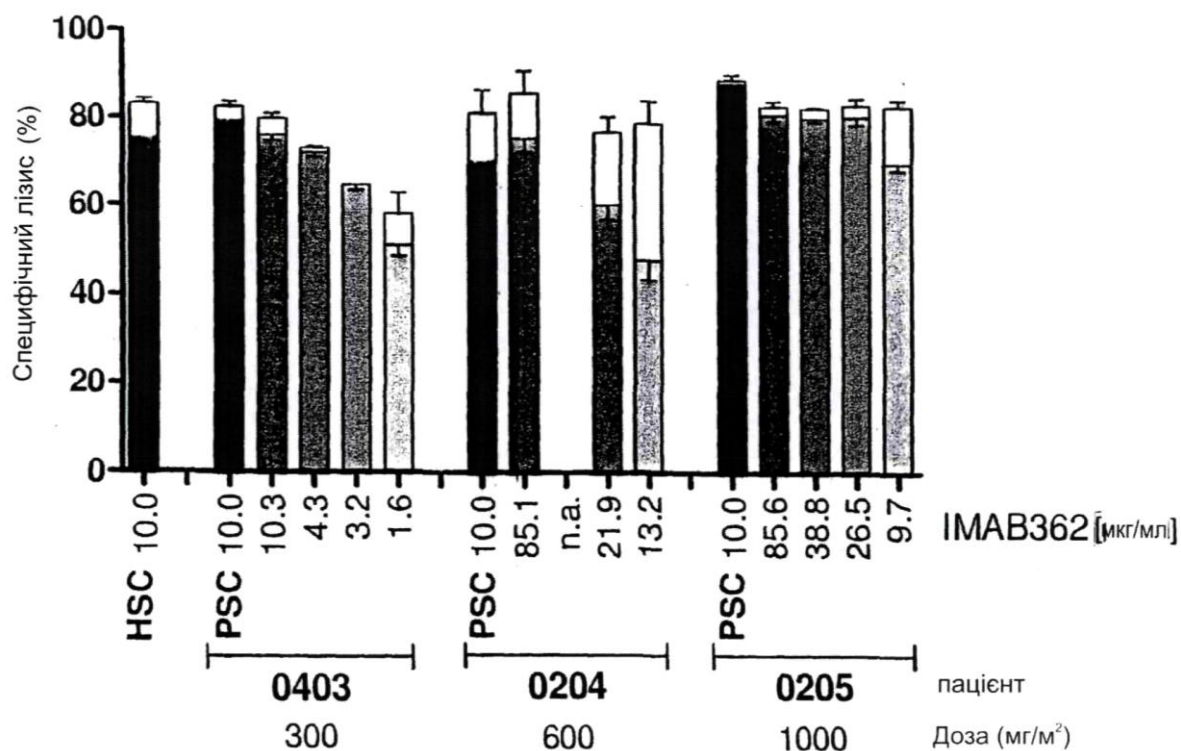
Фіг. 5



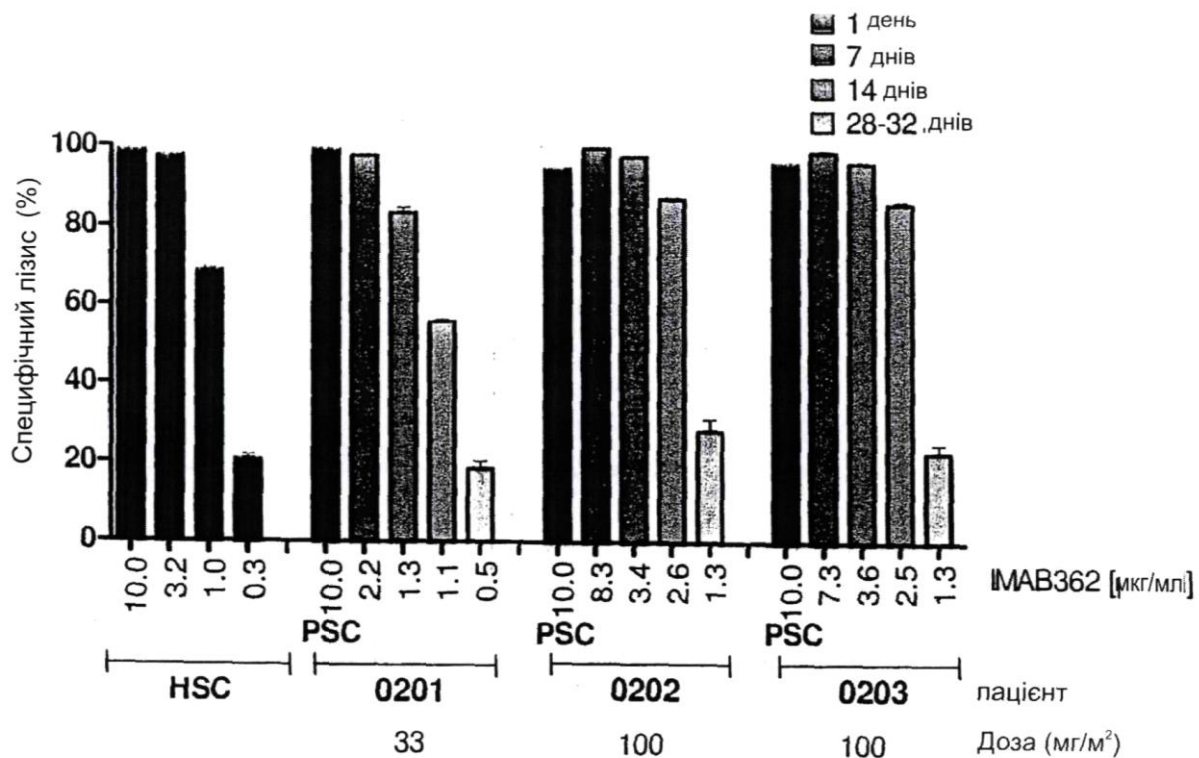
Фіг. 5 (продовження)



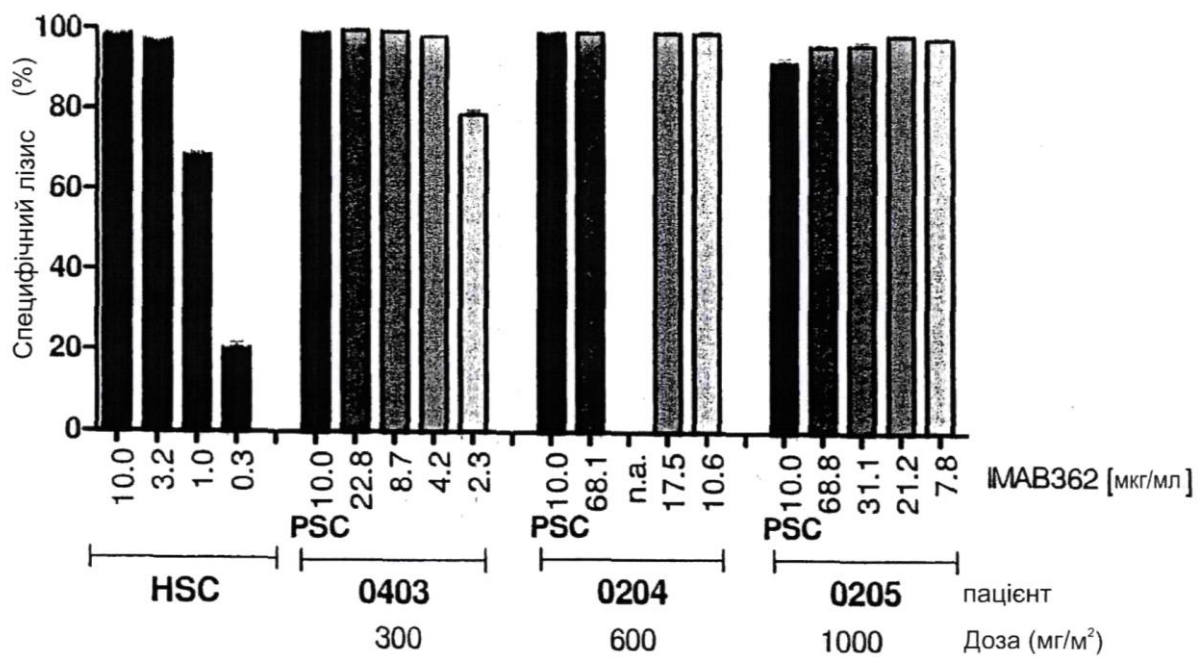
Фіг. 6



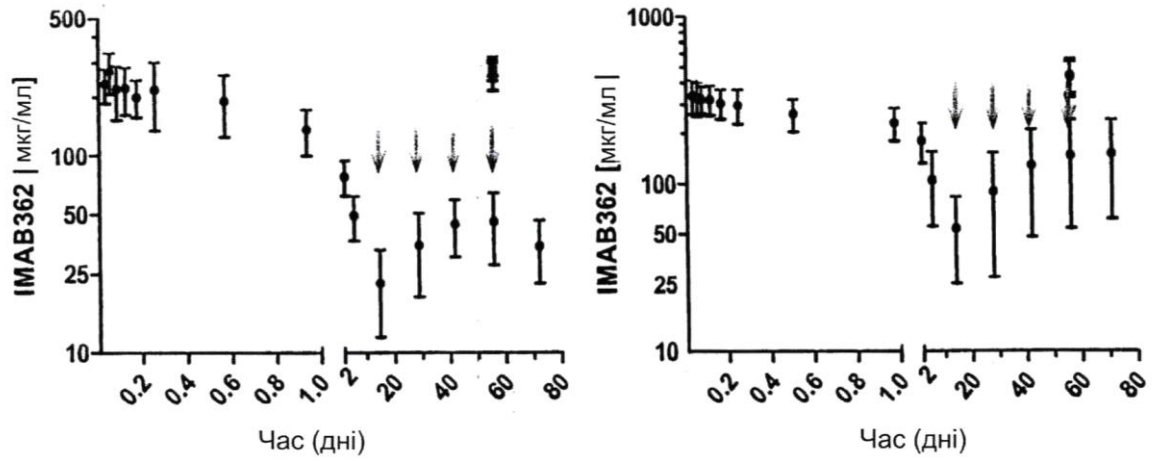
Фіг. 6 (продовження)



Фіг. 7

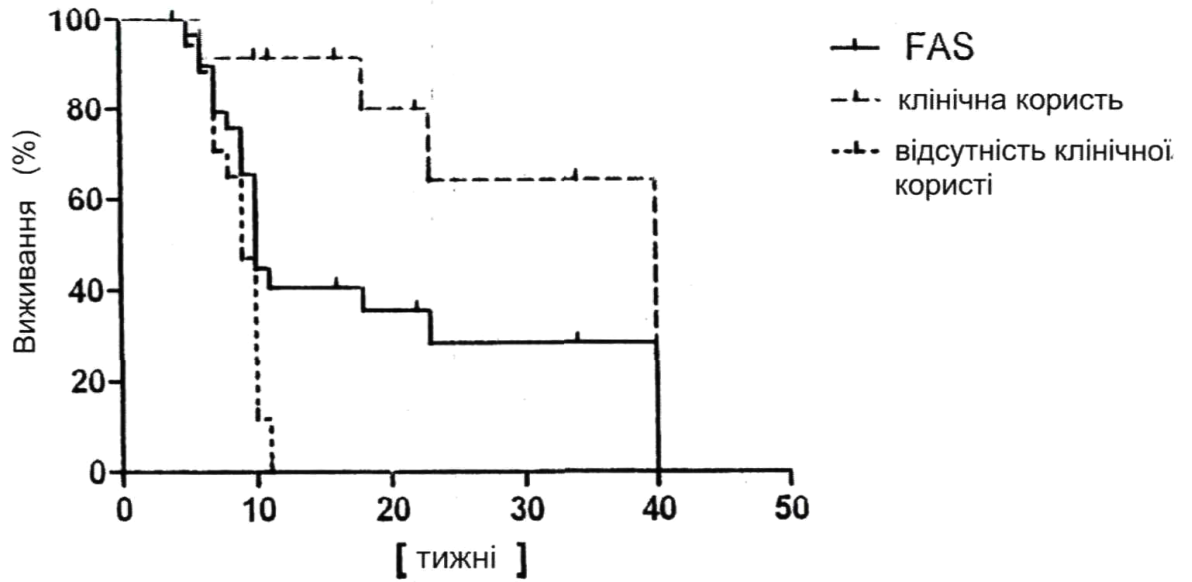


Фіг. 7 (продовження)



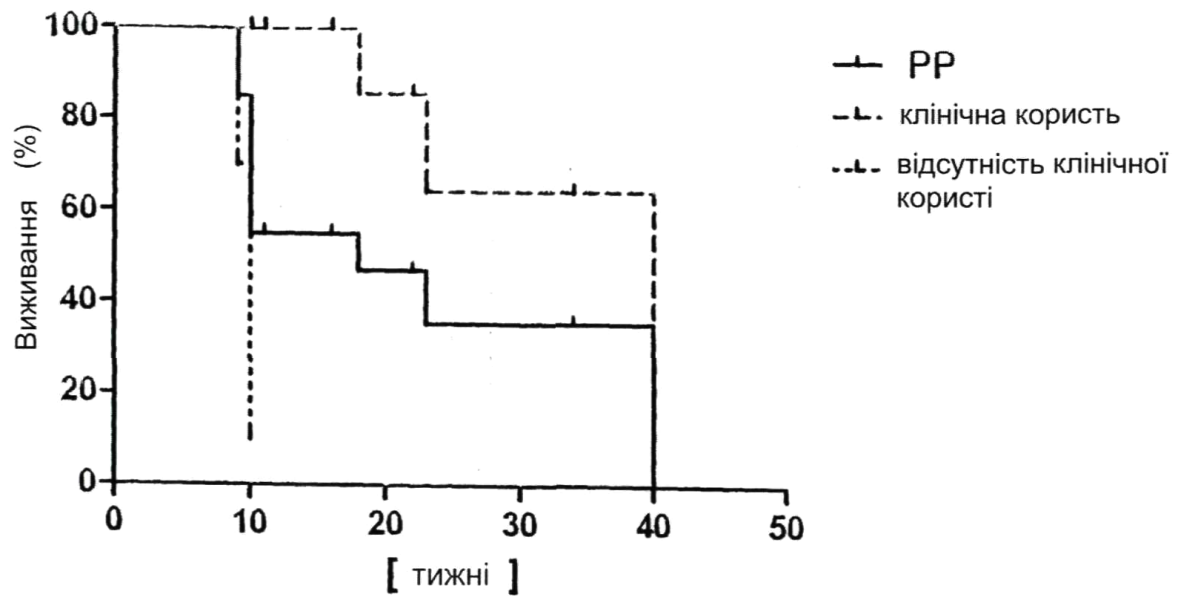
Фіг. 8

Графік кривої виживання без прогресування захворювання (PFS), одержаний за методом Каплана-Мейєра



Фіг. 9

Графік кривої виживання без прогресування захворювання (PFS),
одержаний за методом Каплана-Мейера



Фіг. 10

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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