



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123428** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 01865**
(22) Дата подання заявки: **30.07.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **08.04.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **PCT/EP2013/002272**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **31.07.2013**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **26.09.2016, Бюл.№ 18**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **07.04.2021, Бюл.№ 14**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2014/066330, 30.07.2014**
(72) Винахідник(и):
Сахін Угур (FR),
Тюречі Езлем (FR),
Вальтер Корден (DE),
Ваґнер Майке (DE),
Кройцберг Марія (DE),
Хекер Сабіне (DE),
Якобс Штефан (DE)

(73) Володілець (володільці):
БІОНТЕХ АГ,
An der Goldgrube 12, 55131 Mainz, Germany (DE),
ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ГмбХ,
An der Goldgrube 12, 55131 Mainz, Germany (DE),
ТРОН - ТРАНСЛАЦІОНАЛЕ ОНКОЛОГІ АН
ДЕР УНІВЕРЗІТЕТСМЕДІЦІН ДЕР
ЙОХАННЕС ГҮТЕНБЕРГ-УНІВЕРЗІТЕТ
МАЙНЦ ГЕМАЙННЮТЦІГЕ ГмбХ,
Freiligrathstr. 12, 55131 Mainz, Germany (DE)
(74) Представник:
Слободянюк Тарас Олександрович,
реєстр. №217
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2011057788 A1, 19.05.2011
WO 2012003956 A1, 12.01.2012
Distinct expression pattern of claudin-6, a primitive phenotypic tight junction molecule, in germ cell tumours and visceral carcinomas / Tetsuo Ushiku, Aya Shinozaki-Ushiku, Daichi Maeda et al. // Histopathology. – 2012. – Vol. 61 (6). – P. 1043-1056
Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells / Uri Ben-David, Neta Nudel, Nissim Benvenisty // Nature Communications. – 2013. – Vol. 4. – P. 1-8
Plasma Membrane Proteomics of Human Embryonic Stem Cells and Human Embryonal Carcinoma Cells / Wilma Dormeyer, Dennis van Hoof, Stefan R. Braam et al. // Journal of Proteome Research. – 2008. – Vol. – 7. – P. 2936–2951

UA 123428 C2

	<p>(56) Pamela A. Trail Antibody Drug Conjugates as Cancer Therapeutics / A. Pamela // Antibodies. – 2013. – Vol. 2 (1). – P. 113-129</p> <p>Kwon M. J. Emerging Roles of Claudins in Human Cancer / Mi Jeong Kwon // International Journal of Molecular Sciences. - 2013. - Vol. 14 (9). - P. 18148-18180</p> <p>Turksen K. Claudins and Cancer Stem Cells / Kursad Turksen // Stem cell reviewz and reports. - 2011. - Vol. 7. - P. 797–798</p> <p>Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / Aleix Prat, Joel S. Parke, Olga Karginova et al. // Breast cancer research. - 2010. - Vol. 12 (5). - P. R68</p> <p>Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells / Linlin Wang, Yan Xue, Yihang Shen et al. // Cell Research. - 2012. - Vol. 22 (6). - P. 1082-1085</p>
--	--

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РАКУ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЄТЬСЯ РАКОВИМИ КЛІТИНАМИ, ЯКІ ЕКСПРЕСУЮТЬ CLDN6

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який включає інгібування й/або знищення ракових стовбурових клітин шляхом уведення комбінованої терапії пацієнтові, яка включає синергійно ефективні кількості хіміотерапії і антитіла до CLDN6, де хіміотерапія включає агент, вибраний з групи, яка складається з карбоплатину, гемцитабіну, паклітакселю і цисплатину, доксорубіцину, топотекану і РЕВ. Також винахід стосується кон'югату антитіло-лікарський засіб, де лікарським засобом є DM1 або MMAE, фармацевтичної композиції та набору для лікування раку.

Зазвичай протипухлинна терапія переважно передбачає спроби селективного виявлення й знищення ракових клітин, в основному тих, які є швидкоростучими (тобто клітин, які утворюють основну масу пухлини) і в більшості випадків здійснює токсичний вплив на ракові клітини, втручаючись у клітинні механізми, задіяні в процесах клітинного росту і реплікації ДНК. Більше того, стандартні режими лікування онкологічних захворювань головним чином розраховані на застосування максимальної дози опромінення або хіміотерапевтичного засобу за відсутності неспецифічної токсичності, тобто дози, відомої під назвою "максимальна переносима доза" (MTD).

Крім того, протоколи хіміотерапії часто включають введення комбінації хіміотерапевтичних засобів для збільшення ефективності лікування. Незважаючи на доступність цілого ряду хіміотерапевтичних засобів, ці варіанти лікування мають багато недоліків. Наприклад, хіміотерапевтичні засоби викликають істотні, а найчастіше небезпечні, побічні дії внаслідок неспецифічних побічних ефектів на швидкоростучі клітини, як нормальні, так і злоякісні.

Інші типи протипухлинної терапії включають хірургічне втручання, гормональну терапію, імунотерапію, епігенетичну терапію, антиангіогенну терапію, таргетну (спрямовану на мішень) терапію й променеви терапію для знищення неопластичних клітин у пацієнта.

Однак усі традиційні підходи до терапії раку мають істотні недоліки для пацієнта, включаючи відсутність ефективності (зокрема, відносно віддалених результатів) і токсичність. Відповідно, необхідні нові види терапії для лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

З'являється усе більше даних про те, що в пухлині існує субпопуляція ракових клітин, яка зберігає властивості, подібні до властивостей стовбурових клітин. Ця субпопуляція називається раковими стовбуровими клітинами (CSC). Ракові стовбурові клітини мають властивості, подібні до нормальних стовбурових клітин, вони мають здатність до самопідтримання та утворення всіх гетерогенних клітинних типів пухлини. Ефективною перевіркою в плані дослідження CSC-подібних властивостей пухлинних клітин є аналіз колонієутворення. Використовуючи цей аналіз, можна легко перевірити здатність до самопідтримання й можливості окремих пухлинних клітин утворювати пухлини.

Вважається, що ракові стовбурові клітини здатні ініціювати утворення пухлини, підтримувати ріст пухлини й можливо приводити до поширення пухлини у віддалені органи. Ракові стовбурові клітини включають унікальну субпопуляцію, яка є більш туморогенною, у порівнянні з іншими клітинами пухлини (тобто основною масою пухлини), які відносно повільніше ростуть або є "дрімаючими", а також вона часто є відносно більш хеморезистентною, ніж основна маса пухлини. Оскільки загальноприйнята протипухлинна терапія націлена на швидко проліферуючі клітини (тобто клітини, які утворюють основну масу пухлини), вважаються, що ці способи лікування є відносно неефективними для націлювання й знищення ракових стовбурових клітин. Ракові стовбурові клітини можуть демонструвати інші особливості, які роблять їх відносно хеморезистентними, такі як множинна лікарська стійкість і антиапоптотичні шляхи. Нездатність правильно націлюватися й знищувати ракові стовбурові клітини є основною причиною нездатності стандартних режимів протипухлинної терапії забезпечити тривалий позитивний ефект у багатьох пацієнтів з раком. Таким чином, ракові стовбурові клітини можуть не тільки бути основною причиною рецидиву рака після лікування неефективними лікарськими засобами, але також можуть бути головною причиною утворення метастазів злоякісної пухлини. Отже, однією потенційною можливістю для лікування раку є знищення ракових стовбурових клітин.

Клаудини – інтегральні мембранні білки, основні компоненти щільних контактів епітелію й ендотелію. Ймовірно клаудини мають чотири трансмембранні сегменти із двома позаклітинними петлями, при цьому N- і C-кінці розташовуються в цитоплазмі. Родина трансмембранних білків клаудинів (CLDN) відіграє вирішальну роль у збереженні епітеліальних і ендотеліальних щільних контактів, крім того вони відіграють роль у підтримці цитоскелету й передачі клітинного сигналу. CLDN6 експресується в цілому ряді ракових клітин людини, тоді як експресія в нормальних тканинах обмежується плацентою.

У цій роботі ми приводимо дані, які демонструють, що експресія CLDN6 активується в ході утворення плюрипотентних клітин. Крім того, CLDN6 значною мірою пов'язаний з відомими маркерами ракових стовбурових клітин, причому CLDN6-позитивні пухлинні клітини демонструють посилене утворення колоній. Також показано, що терапія з використанням CLDN6-специфічних антитіл може подолати резистентність пухлин до хіміотерапії, наприклад, рака яєчника, причому комбінація хіміотерапії й терапії антитілами до CLDN6 має помітну синергійну дію.

Представлені в цьому документі результати демонструють, що CLDN6 є новим маркером ракових стовбурових клітин, і що на ракові стовбурові клітини можна націлюватися з діагностичною або терапевтичною метою шляхом націлювання на CLDN6.

Розкриття винаходу

В одному аспекті даний винахід має відношення до способу виявлення ракових стовбурових клітин, який передбачає виявлення клітин, які експресують CLDN6.

В одному варіанті здійснення наявність клітин, які експресують CLDN6, указує на наявність ракових стовбурових клітин і/або кількість клітин, які експресують CLDN6, корелює з кількістю ракових стовбурових клітин. В одному варіанті здійснення клітини, які експресують CLDN6, виявляють у зразку, отриманому від пацієнта з раком, наприклад, до, під час і/або після лікування раку. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає кількісне й/або якісне встановлення клітин, які експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає порівняння кількості клітин, які експресують CLDN6, з кількістю клітин, які експресують CLDN6 в еталонному зразку або із заздалегідь установленим діапазоном еталонних значень. Еталонний зразок може бути зразком, отриманим від пацієнта, у якого не було діагностовано раку. Заздалегідь установлений діапазон еталонних значень може ґрунтуватися на вибірці пацієнтів, у яких не було діагностовано раку. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає моніторинг кількості ракових стовбурових клітин у онкологічного пацієнта, при цьому моніторинг кількості ракових стовбурових клітин в онкологічного пацієнта переважно включає порівняння кількості ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від даного онкологічного пацієнта, з кількістю ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому раніше від онкологічного пацієнта. В одному варіанті здійснення зразок, отриманий від онкологічного пацієнта, є зразком, узятим в онкологічного пацієнта під час або після проведення протипухлинної терапії.

У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу моніторингу ефективності протипухлинної терапії в онкологічного пацієнта, який передбачає: (i) визначення кількості ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від даного онкологічного пацієнта, під час або після проведення протипухлинної терапії; і (ii) порівняння кількості ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від онкологічного пацієнта, з кількістю ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому раніше від даного онкологічного пацієнта, при цьому встановлення кількості ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від онкологічного пацієнта, і/або встановлення кількості ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому раніше від даного онкологічного пацієнта, включає визначення кількості клітин, які експресують CLDN6.

В одному варіанті здійснення зразок, отриманий від онкологічного пацієнта, є зразком, узятим в онкологічного пацієнта до, під час або після проведення протипухлинної терапії.

В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу стабілізація або зменшення кількості ракових стовбурових клітин показує, що протипухлинна терапія є ефективною. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу збільшення кількості ракових стовбурових клітин показує, що протипухлинна терапія є неефективною. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу протипухлинна терапія є терапією, спрямованою проти ракових стовбурових клітин. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу зразок, отриманий від онкологічного пацієнта, є біологічною рідиною або зразком пухлини, отриманим за допомогою біопсії. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу зразок зазнає одного або більше етапів попередньої обробки. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу виявляють клітини, які експресують CLDN6 або визначають їхню кількість шляхом виявлення або визначення кількості білка CLDN6 і/або мРНК CLDN6. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу виявляють клітини, які експресують CLDN6 або визначають їхню кількість за допомогою імуноаналізу, при цьому імуноаналіз бажано вибирають із групи, яка складається з вестерн-блотинга, імуногістохімічного аналізу, радіоімуноаналізу, твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), "сендвіч" імуноаналізу, аналізу імунопреципітації, реакцій преципітації, реакцій дифузійної преципітації в гелі, імунодифузного аналізу, реакцій аглютинації, реакцій зв'язування комплементу, кількісного радіоімуного аналізу, флуоресцентного імуноаналізу, імунофлуоресценції, імуноаналізу білка А, проточної цитометрії й FACS-аналізу. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу виявляють клітини, які експресують CLDN6 або визначають їхню кількість із використанням антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу клітини, які експресують CLDN6, є раковими клітинами, які експресують CLDN6, і/або клітинами, присутніми в місці локалізації пухлини.

У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу лікування або запобігання раку, який передбачає інгібування й/або знищення ракових стовбурових клітин шляхом уведення онкологічному пацієнтові антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6.

В одному варіанті здійснення ракові стовбурові клітини експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення даний спосіб додатково передбачає застосування хіміотерапії й/або променевої терапії. В одному варіанті здійснення інгібування й/або знищення ракових

стовбурових клітин підсилює протиракову дію хіміотерапії й/або променевої терапії, при цьому посилення протиракової дії хіміотерапії й/або променевої терапії бажано передбачає збільшення тривалості життя онкологічного пацієнта, який піддається лікуванню з використанням хіміотерапії й/або променевої терапії.

5 У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу лікування або запобігання раку, який передбачає введення (i) антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і (ii) хіміотерапію онкологічного пацієнта.

В одному варіанті здійснення злоякісна пухлина містить ракові стовбурові клітини, які експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення, введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, призводить до інгібування або знищення ракових стовбурових клітин, які експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, підсилює протипухлинну дію хіміотерапії, при цьому посилення протипухлинної дії хіміотерапії бажано передбачає збільшення тривалості життя пацієнтів, що мають злоякісні утворення і які піддавались лікуванню з використанням хіміотерапії.

15 В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу знищення ракових стовбурових клітин призводить до лікування раку. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6 і хіміотерапія вводяться в синергійно ефективних кількостях. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу хіміотерапія вводиться в дозі, меншій, ніж максимальна переносима доза. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу хіміотерапія включає введення засобу, обраного із групи, яка складається з таксанів, сполук платини, нуклеозидних аналогів, аналогів камптотечину, антрациклінів, їх проліків, їхніх солей та їх комбінацій. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу хіміотерапія включає введення засобу, обраного із групи, яка складається з паклітакселю, цисплатину, карбоплатину, їх проліків, їхніх солей та їх комбінацій. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу ракові стовбурові клітини знаходяться у місці локалізації пухлини в пацієнта. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу злоякісна пухлина є резистентною до хіміотерапії, зокрема, при використанні монотерапії. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, проявляє інгібуючу й/або цитотоксичну дію на ракові стовбурові клітини, при цьому антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, проявляє своє інгібуючу й/або цитотоксичну дію на ракові стовбурові клітини переважно за допомогою одного або більше механізмів із числа опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю лізису (CDC), опосередкованого антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю лізису (ADCC), індукції апоптоза й інгібування проліферації. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, з'єднане з терапевтичною молекулою й може бути кон'югатом антитіла з лікарським засобом, як описано в даному документі. В одному варіанті здійснення терапевтичний фрагмент є цитотоксичним засобом, хіміотерапевтичним засобом або радіоактивним ізотопом. В одному варіанті здійснення терапевтичний фрагмент впливає на клітини, для яких характерним є повільний ріст. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN6. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент.

У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу лікування або запобігання раку у онкологічного пацієнта, який передбачає введення, кон'югата антитіла з лікарським засобом, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, ковалентно зв'язане з допомогою лінкера, щонайменше, з однією молекулою токсичного лікарського засобу.

В одному варіанті здійснення молекула токсичного лікарського засобу здатна проникати крізь клітинну мембрану. В одному варіанті здійснення, щонайменше, один з токсичних лікарських засобів впливає на клітини, для яких характерний повільний ріст. В одному варіанті здійснення токсичний лікарський засіб є майтансиноїдом або ауристатином. В одному варіанті здійснення майтансиноїд вибирають із групи, яка складається з DM1 і DM4. В одному варіанті здійснення ауристатин вибирають із групи, яка складається з монометил ауристатину E (MMAE) і монометил ауристатину F (MMAF). В одному варіанті здійснення лінкер є розщеплюваним лінкером, бажано лінкером, який розщеплюється катепсином. В одному варіанті здійснення антитіло з'єднується з лінкером через тіол цистеїну антитіла.

60 В одному варіанті здійснення злоякісна пухлина містить ракові стовбурові клітини, які

експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення введення кон'югата антитіло-лікарський засіб призводить до інгібування або знищення ракових стовбурових клітин, які експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення знищення ракових стовбурових клітин приводить до лікування раку. В одному варіанті здійснення ракові стовбурові клітини перебувають у місці локалізації пухлини в онкологічного пацієнта. В одному варіанті здійснення кон'югат антитіло-лікарський засіб проявляє інгібуючу й/або цитотоксичну дію на ракові стовбурові клітини, причому кон'югат антитіло-лікарський засіб проявляє інгібуючу й/або цитотоксичну дію на ракові стовбурові клітини переважно шляхом індукції апоптоза й/або інгібування проліферації.

В одному варіанті здійснення спосіб також передбачає застосування хіміотерапії й/або променевої терапії. В одному варіанті здійснення введення кон'югата антитіло-лікарський засіб посилює протиракову дію хіміотерапії й/або променевої терапії, при цьому посилення протиракової дії хіміотерапії й/або променевої терапії бажано передбачає збільшення тривалості життя онкологічного пацієнта, який проходить курс хіміотерапії й/або променевої терапії.

В одному варіанті здійснення кон'югат антитіло-лікарський засіб і хіміотерапія вводяться в синергію ефективних кількостях. В одному варіанті здійснення хіміотерапія вводиться в дозі, більш низькій, ніж максимально переносима доза. В одному варіанті здійснення хіміотерапія включає введення засобу, обраного із групи, яка складається з таксанів, сполук платини, нуклеозидних аналогів, аналогів камптотецину, антрациклінів, їх проліків, їхніх солей та їх комбінацій. В одному варіанті здійснення хіміотерапія включає введення засобу, обраного із групи, яка складається з паклітакселю, цисплатину, карбоплатину, їх проліків, їхніх солей та їх комбінацій. В одному варіанті здійснення злоякісна пухлина є стійкою до хіміотерапії, зокрема, при введенні у вигляді монотерапії.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зокрема, якщо воно присутнє в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, має афінність й/або специфічність до CLDN6, що забезпечує можливість ендцитозу антитіла й/або кон'югата антитіло-лікарський засіб. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6 і присутнє в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN6. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6 і присутнє в кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка включає амінокислотну послідовність представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент.

В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу CLDN6 має амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2. В одному варіанті здійснення способу у всіх аспектах винаходу злоякісне новоутворення включає первинний рак, прогресуючий рак, метастатичний рак, рецидив раку або їх комбінацію.

У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу лікування або запобігання раку, який передбачає (i) виявлення ракових стовбурових клітин в онкологічного пацієнта способом запропонованим винаходом і (ii) уведення пацієнтові протипухлинної хіміотерапії, спрямованої проти ракових стовбурових клітин. В одному варіанті здійснення протипухлинна хіміотерапія, спрямована проти ракових стовбурових клітин, включає здійснення способу винаходу для лікування або запобігання раку.

У наступному аспекті даний винахід має відношення до способу запобігання хеморезистентності рака, рецидиву раку або утворенню метастазів рака, зокрема, під час або після лікування раку, у тому числі лікування рака способом запропонованим винаходом.

У наступному аспекті даний винахід забезпечує медичний препарат для лікування або запобігання раку, що містить (i) антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і (ii) хіміотерапевтичний засіб. Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і хіміотерапевтичний засіб можуть бути присутніми у медичному препараті у вигляді суміші або окремо один від одного. Медичний препарат може мати форму набору, який включає перший контейнер, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і другий контейнер, який містить хіміотерапевтичний засіб. Медичний препарат може також включати надруковані інструкції із застосування препарату для лікування або запобігання раку, зокрема, із застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні варіанти здійснення медичного препарату й, зокрема, антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і хіміотерапевтичного засобу описані в даному документі.

В окремому аспекті даний винахід пропонує медичний препарат, який включає (i) антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і (ii) паклітаксел. Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і паклітаксел можуть бути присутніми у медичному препараті у вигляді

суміші або окремо один від одного. Медичний препарат може призначатись для лікування раку, наприклад, рака яєчника. Медичний препарат може мати форму набору, який включає перший контейнер, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і другий контейнер, який містить паклітаксел. Медичний препарат може також включати надруковані інструкції із застосування препарату для лікування або запобігання раку, такого як рак яєчника, зокрема, із застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні варіанти здійснення медичного препарату й, зокрема, антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, описані в даному документі.

У наступному аспекті даний винахід пропонує кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, ковалентно зв'язане лінкером, щонайменше, з однією молекулою токсичного лікарського засобу.

В одному варіанті здійснення токсичний лікарський засіб здатний проникати крізь клітинну мембрану. В одному варіанті здійснення, щонайменше, один з токсичних лікарських засобів впливає на клітини, для яких характерний повільний ріст. В одному варіанті здійснення токсичний лікарський засіб є майтансиноїдом або ауристатином. В одному варіанті здійснення майтансиноїд вибирають із групи, яка складається з DM1 і DM4. В одному варіанті здійснення ауристатин вибирають із групи, яка складається з монометил ауристатину E (MMAE) і монометил ауристатину F (MMAF). В одному варіанті здійснення лінкер є, розщеплюваним лінкером, бажано, лінкером, який розщеплюється катепсином. В одному варіанті здійснення антитіло з'єднується з лінкером через тіол цистеїну антитіла.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зокрема, якщо воно присутнє в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, має афінність й/або специфічність до CLDN6, що забезпечує можливість ендцитоза антитіла й/або кон'югата антитіло-лікарський засіб. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, у кон'югаті антитіло-лікарський засіб зв'язується з першою позаклітинною петлею CLDN6. В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, у кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL), яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент.

У наступному аспекті даний винахід пропонує фармацевтичну композицію, яка містить кон'югат антитіло-лікарський засіб запропонований винаходом й фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або ексципієнт.

У наступному аспекті даний винахід пропонує медичний препарат, який містить кон'югат антитіло-лікарський засіб запропонований винаходом й хіміотерапевтичний засіб. Бажано, медичний препарат призначено для лікування або запобігання раку. Кон'югат антитіло-лікарський засіб і хіміотерапевтичний засіб можуть бути присутніми у медичному препараті у вигляді суміші або окремо один від одного. Медичний препарат може мати форму набору, який включає перший контейнер, який містить кон'югат антитіло-лікарський засіб, і другий контейнер, який містить хіміотерапевтичний засіб. Медичний препарат може також включати надруковані інструкції із застосування препарату для лікування або запобігання раку, зокрема, із застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні варіанти здійснення медичного препарату й, зокрема, кон'югата антитіло-лікарський засіб, описані в даному документі.

В окремому аспекті даний винахід пропонує медичний препарат, який містить кон'югат антитіло-лікарський засіб запропонований винаходом й паклітаксел. Кон'югат антитіло-лікарський засіб і паклітаксел можуть бути присутніми у медичному препараті у вигляді суміші або окремо один від одного. Медичний препарат може призначатись для лікування або запобігання раку, такого як рак яєчника. Медичний препарат може мати форму набору, який включає перший контейнер, який містить кон'югат антитіло-лікарський засіб, і другий контейнер, який містить паклітаксел. Медичний препарат може також включати надруковані інструкції із застосування препарату для лікування або запобігання раку, такого як рак яєчника, зокрема, із застосування препарату способом запропонованим винаходом. Різні варіанти здійснення медичного препарату й, зокрема, кон'югата антитіло-лікарський засіб, описані в даному документі.

Даний винахід також пропонує описані в цьому документі засоби й композиції, такі як кон'югат антитіло-лікарський засіб, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і/або хіміотерапевтичний засіб для застосування в описаних в даному документі способах. Наприклад, даний винахід також пропонує кон'югат антитіло-лікарський засіб або антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, для введення в комбінації з хіміотерапевтичним засобом,

таким як паклітаксел.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, є моноклональним, химерним або гуманізованим антитілом, або фрагментом антитіла. В одному варіанті здійснення антитіло опосередковує лізис клітин при зв'язуванні із клітинним CLDN6, зокрема, з CLDN6, який експресується клітинами на клітинній поверхні, при цьому клітини бажано є раковими стовбуровими клітинами, такими як ракові стовбурові клітини, описані в цьому документі.

Згідно з винаходом рак бажано вибирають із групи, яка складається з раку яєчника, зокрема, аденокарциноми яєчника й тератокарциноми яєчника, рака легенів, включаючи дрібноклітинний рак легенів (SCLC) і недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), зокрема, плоскоклітинну карциному й аденокарциному легенів, крупноклітинного рака (LCC), рака шлунка, рака молочної залози, рака печінки, рака підшлункової залози, рака шкіри, зокрема, базальноклітинної карциноми й плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, рака голови й шиї, зокрема, злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, зокрема, синовіальної саркоми й карциносаркоми, рака жовчовивідних шляхів, рака сечового міхура, зокрема, перехідно-клітинної карциноми й папілярної карциноми, рака нирок, зокрема, нирково-клітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирок й папілярний рак нирок, рак товстої кишки, рак тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема, аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, плацентарну аденокарциному, рак шийки матки, рак яєчка, зокрема, семіному яєчка, тератому яєчка та ембріональну карциному яєчка, рак матки, герміногенні пухлини, такі як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема, герміногенні пухлини яєчка і яєчника та їх метастатичні форми.

Згідно з винаходом ракові клітини й/або ракові стовбурові клітини, які експресують CLDN6, бажано є клітинами раку, описаного в даному документі.

В одному варіанті здійснення описаний тут рак є CLDN6-позитивним. В одному варіанті здійснення ракові клітини описаного тут раку є CLDN6-позитивними. В одному варіанті здійснення ракові клітини описаного тут раку експресують CLDN6 на своїй клітинній поверхні.

В одному варіанті здійснення описаний у цьому документі рак включає первинний рак, прогресуючий рак, метастатичний рак, рецидив раку або їх комбінацію, наприклад, комбінацію первинного раку й метастатичного раку. В одному варіанті здійснення рак є частково або повністю резистентним до хіміотерапії, такої як монотерапія паклітакселем. В одному варіанті здійснення рак є раком яєчника, зокрема, раком яєчника, частково або повністю резистентним до хіміотерапії, такої як монотерапія паклітакселем.

Інші характерні ознаки й переваги даного винаходу стануть очевидними виходячи з наступного докладного опису винаходу й пунктів формули винаходу.

Короткий опис креслень

Фігура 1. мРНК CLDN6 експресується в людських клітинах iPS

Людські фібробласти крайньої плоти (HFF) були трансфіковані з використанням ліпофектаміну RNAiMAX (Life Technologies) або без РНК (відсутність РНК контролю) або з використанням суміші для репрограмування (немодифікована суміш OSKMNL+EBK+miR), клітини збирали через 5, 12 і 19 днів після обробки. РНК екстрагували, транскрибували в кДНК і після цього аналізували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (RT-ПЛР) з використанням секвенатора ABI PRISM 7300 і комп'ютерного забезпечення (Applied Biosystems з використанням набору QuantiTect SYBR green Kit (Qiagen)). Показана кратна індукція CLDN6-експресії клітин, оброблених сумішшю для репрограмування (чорні стовпчики) відносно HFF клітин з 1 дня обробки (сірі стовпчики). Експресію мРНК CLDN6 нормували відносно експресії мРНК гена "домашнього господарства" HPRT1. OSKMNL = фактори транскрипції OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG і LIN28, EBK=IFN-escape білки E3, K3 і B18R, miR-mix=miRNA-302a/b/c/d і 367.

Фігура 2. CLDN6 експресується на клітинній поверхні людських iPS клітин

HFF клітини трансфікували без РНК (без РНК контролю) або з використанням суміші для репрограмування (немодиф. суміш OSKMNL+EBK+miR), потім клітини збирали на 5 день (A), 12 день (B) і 19 день (C) після обробки. Клітини фарбували 1 мкг/мл CLDN6-специфічними IMAB027-AF647 і SSEA-4-V450 антитілами (2,5 мкл на тест, придбаними в компанії BD) протягом 30 хв. при 4 °C і аналізували поверхневу експресію шляхом проточної цитометрії. Експеримент був проведений два рази, представлені характерні точкові діаграми. OSKMNL = транскрипційні фактори OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG і LIN28, EBK=IFN-escape білки E3, K3 і B18R, miR-mix=miRNA-302a/b/c/d і 367.

Фігура 3. поверхнева експресія CLDN6 на лінії клітин рака яєчника

З метою дослідження CLDN6-експресії клітини 1E6 фарбували 1 мкг/мл IMAB027-AF647

протягом 30 хвилин при 4 °C і аналізували поверхневу експресію за допомогою проточної цитометрії. На (A) показані COV318 клітини. Експерименти проводили по три рази, представлена одна характерна точкова діаграма. На (B) показані PA-1 клітини, стійко трансфіковані або контрольним вектором (PA-1 76) або вектором, який експресує shRNAs до CLDN6 (клони PA-1 50 і PA-1 54). Експерименти проводили по три рази, представлена одна характерна точкова діаграма. shRNA= невелика шпилькова РНК.

Фігура 4. CLDN6 має велике значення для колонієутворення клітин раку яєчника

З метою дослідження клоногенної поведінки COV318, PA-1 50 і PA-1 54 клітини фарбували 1 мкг/мл IMAB027-AF647 протягом 30 хвилин при 4 °C, після чого 700 (COV318) або 500 (PA-1 50/54) CLDN6-позитивних або CLDN6-негативних клітин відсортували в 6-коміркові планшети. Дали можливість клітинам сформувати колонії протягом 14 днів, після чого фарбували 0,5 % кристалічним фіолетовим протягом 20 хвилин. (A) Показане характерне зображення для кожної лінії клітин. (B) Кількість колоній визначали підрахунком "вручну". Показані середні значення й середньоквадратичне відхилення, отримані в результаті трьох незалежних експериментів.

Фігура 5. CLDN6 коекспресується з CSC-маркерами CD24, CD90 і CD44 у клітинній лінії раку яєчника COV318

1E6 COV318 клітини фарбували протягом 30 хвилин при 4 °C антитілами проти різних поверхневих маркерів згідно FACS-панелі, представленої в Таблиці 1 і аналізували експресію CSC-маркерів за допомогою проточної цитометрії. Експерименти проводили тричі. На (A) показані характерні точкові діаграми колокалізації CLDN6 з різними встановленими CSC-маркерами. (B) На осі X діаграми показані процентні вмісти колокалізації CD44, CD24, CD90 і CLDN6-позитивних клітин, які були обчислені з використанням різних стратегій. Показані середні значення із трьох повторностей і середньоквадратичні відхилення.

Фігура 6. Збагачення клітин, які експресують CLDN6, приводить до нагромадження встановлених CSC маркерів

COV318 клітини фарбували 0,5 мкг/мл IMAB027 і вторинними APC-кон'югованими козячими вторинними антитілами до IgG людини (1:300), після цього за допомогою FACS-сортування були виділені CLDN6-позитивні й CLDN6-негативні фракції. Клітини обох фракцій вирощували протягом 10 днів. 1E6 клітини кожної фракції фарбували протягом 30 хвилин при 4 °C антитілами до різних поверхневих маркерів згідно FACS-панелі, показаної в Таблиці 1. Експеримент проводили тричі. На (A) показані характерні точкові діаграми рівнів експресії різних CSC-маркерів в CLDN6-позитивній й CLDN6-негативній фракції, а також їх колокалізація з CLDN6. На (B) показані процентні вмісти рівнів експресії CSC-маркерів у вигляді діаграми, причому коефіцієнти збагачення (кратна експресія) для характерних маркерів CD44, CD90 і CD24 були обчислені шляхом порівняння процентних вмістів позитивних клітин в CLDN6-позитивній й CLDN6-негативній фракції.

Фігура 7. Лінії клітин з високою експресією CLDN6 демонструють нагромадження CSC-маркерів у порівнянні із клітинами з низькою експресією CLDN6

1E6 клітини ліній рака яєчника OV90 (A) і PA-1 (B) з високою експресією CLDN6 або клітини ліній карциноми яєчка NEC-8 (C) і NEC-14 (D) фарбували протягом 30 хвилин при 4 °C антитілами до різних поверхневих маркерів згідно FACS-панелі, показаної в Таблиці 1, і аналізували експресію CSC-маркерів за допомогою проточної цитометрії. Експерименти повторювали тричі, показані характерні точкові діаграми.

Фігура 8. Протипухлинна дія IMAB027 у комбінації з паклітакселем на ранній ксенотрансплантатній моделі пухлини

Підшкірні людські ксенотрансплантатні пухлини ES-2, які ектопічно експресують людський CLDN6, лікували 15 мг/кг паклітакселю на 3, 10 і 17 день після трансплантації за допомогою внутрішньоочеревинних (i.p.) ін'єкцій. Підтримуючу терапію антитілами починали на 4 день у вигляді трьох ін'єкцій на тиждень IMAB027 у дозі 35 мг/кг (чергуючи i.v./i.p./i.p.). (A) Кінетична крива середнього росту пухлини (\pm SEM) після лікування IMAB027 (білі квадрати), паклітакселем (сірі кола), IMAB027 у комбінації з паклітакселем (чорні квадрати) або розріджувачем як контролем (білі кола). Стрілки показують час початку лікування. (B) Криві виживання пролікованих мишей. Розмір групи: n=12.

Фігура 9. Протипухлинна дія IMAB027 у комбінації із цисплатином на моделі розвинутої ксенотрансплантатної пухлини

Підшкірні людські ксенотрансплантатні пухлини NEC14 виростали до середнього розміру ~ 100 мм³ до початку лікування. Мишей лікували цисплатином у дозі 1 мг/кг за допомогою i.p. щоденних ін'єкцій з 6 по 10 день після трансплантації й трьох ін'єкцій IMAB027, як підтримуючої терапії, у дозі 35 мг/кг на тиждень (чергуючи i.v./i.p./i.p.), починаючи з 6 дня. (A) Кінетична крива середнього росту пухлини (\pm SEM) після лікування IMAB027 (зафарбоване коло), цисплатином

(незафарбований квадрат), IMAB027 у комбінації із цисплатином (зафарбований квадрат) або розріджувачем як контролем (незафарбоване коло). Стрілки показують час початку лікування. (В) Характерний розмір пухлини в мишей через 24 дні після трансплантації (середнє \pm середньоквадратичне відхилення). (С) Криві виживання пролікованих мишей. Розмір групи: $n=19$. Р-значення: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ і ***, $p < 0,001$.

Фігура 10. Протипухлинна дія IMAB027 у комбінації з карбоплатином на моделі розвинутої ксенотрансплантатної пухлини

Розвинені людські ксенотрансплантатні пухлини NEC14 лікували IMAB027 окремо або в комбінації із цитостатичним лікарським засобом, як описано на Фігурі 9. Замість цисплатину мишей лікували 30 мг/кг карбоплатину на 6, 13 і 20 дні внутрішньоочеревинними болюсними ін'єкціями. (А) Кінетична крива середнього росту пухлини (\pm SEM) після лікування IMAB027 (зафарбоване коло), карбоплатином (незафарбований квадрат), IMAB027 у комбінації з карбоплатином (зафарбований квадрат) або розріджувачем як контролем (зафарбоване коло). Стрілки показують час початку лікування. (В) Характерний розмір пухлини в мишей через 24 дні після трансплантації (середнє \pm середньоквадратичне відхилення). (С) Криві виживання пролікованих мишей. Розмір групи: $n=19$. Р-значення: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ і ***, $p < 0,001$.

Фігура 11. CLDN6 має велике значення для процесу сфероутворення клітинами раку яєчника

Щоб проаналізувати вплив CLDN6 на сфероутворення, CLDN6-позитивні й CLDN6-негативні COV318 клітини були виділені за допомогою сортування флуоресцентно-активованих клітин після фарбування 0,5 мкг/мл IMAB027. CLDN6-позитивні й CLDN6-негативні COV318 клітини вирощували в планшетах з наднизькою можливістю прикріплення за умов, придатних для сфероутворення (безсировоточне DMEM/F12 середовище, яке містить 0,4 % бичачого сироваткового альбуміну, 20 нг/мл основного фактора росту фібробластів, 10 нг/мл епідермального фактора росту й 5 мкг/мл інсуліну). (А) Характерні зображення першого покоління сфер CLDN6-позитивних (CLDN6+) і CLDN6-негативних (CLDN6-) COV318 клітин на 3, 8 і 19 день після сортування. (В) Характерні зображення другого покоління сфер, отриманих з окремих клітин CLDN6+ першого покоління сфер від (А) на 22 день після сортування.

Фігура 12. Нагромадження CLDN6-позитивних клітин після лікування похідними платини

COV318 клітини обробляли цисплатином 500 нг/мл або карбоплатином 2,000 нг/мл протягом 4 днів. Після обробки клітини вирощували за відсутності цитостатичних лікарських засобів протягом 3 додаткових днів (світлі стовпчики) і 6 днів (чорні стовпчики), відповідно. Експресію CLDN6 досліджували за допомогою проточної цитометрії з використанням CLDN6-специфічних антитіл IMAB027 і ізотипових контрольних антитіл. Показана експресія оброблених COV318 відносно необроблених клітин. При оцінці значення ізотипового контролю були відняті від CLDN6-фарбованих.

Фігура 13. Нагромадження CLDN6-позитивних клітин після внутрішньоочеревинної трансплантації

COV318-клітини внутрішньоочеревинно ін'єктували безтимусним "голим" мишам. Мишей, у яких утворювався асцит, піддавали евтаназії, а асцитні й солідні пухлини збирали для одержання додаткових характеристик. Ізольовані клітини аналізували відносно експресії CLDN6 безпосередньо відразу після одержання й після проведення декількох пасажів у культурі клітин. (А) Дослідження за допомогою проточної цитометрії експресії CLDN6 на вихідних COV318 клітинах з використанням CLDN6-специфічних антитіл IMAB027 і ізотипового контролю. (В) експресія CLDN6 на клітинах, отриманих з асцитних і солідних пухлин з яєчника, печінки, шлунка, підшлункової залози й діафрагми в різні моменти часу після виділення (*: асцити на дні 5 і 35; **: солідні пухлини на 12 і 29 день). На осі X показана інтенсивність флуоресценції. Число подій (підрахунок), показаний на осі Y, перерахований як відсоток максимального числа подій.

Фігура 14. CLDN6 корелює з маркерами стовбурових клітин рака яєчника в зразках первинної пухлини

42 зразка раку яєчника досліджували відносно рівнів експресії мРНК CLDN6 і цілого ряду описаних маркерів стовбурових клітин рака яєчника за допомогою qRT-ПЛР із використанням системи виявлення Fluidigm і програмного забезпечення. Був виконаний коефіцієнт рангової кореляції Спірмена, щоб проаналізувати CLDN6 кореляцію зі специфічними маркерами стовбурових клітин рака яєчника. На (А) показані діаграми розсіювання значимих кореляцій (Р-значення $\leq 0,05$). На (В) показана зведена інформація про всі кореляції.

Фігура 15. IMAB 027-опосередкована ADCC після лікування карбоплатином і паклітакселем ADCC-активність IMAB027 у комбінації з хіміотерапією аналізували, використовуючи COV362(Luc) клітинки-мішені. У зв'язку із чим, клітини обробляли протягом 4 днів карбоплатином, гемцитабіном, паклітакселем, доксорубіцином або топотеканом у зазначених

концентраціях. Після обробки клітини росли протягом 3 (A-D) і 10 днів (E-J) за відсутності цитостатичних засобів, відповідно. Контрольні клітини культивували без цитостатиків. (A, C, E, G, I) ADCC експерименти проводили з використанням IMAB027 (чорні лінії) або контрольних ізотипових антитіл (сірі лінії), використовуючи PBMC від здорових донорів із співвідношенням ефектору (PBMC) до клітини-мішені ~40:1. Експериментальні точки (n=4 повторностей) показані у вигляді середнього \pm SD. (B, D, F, H, J). Експресію CLDN6 досліджували за допомогою проточної цитометрії, використовуючи IMAB027. Чорні пунктирні лінії показують експресію CLDN6 у необроблених клітинах, сірі зафарбовані гістограми показують експресію CLDN6 після лікування.

Фігура 16. Протипухлинна дія IMAB027 у комбінації з лікуванням РЕВ на моделі запущеної ксенотрансплантатної пухлини

Підшкірні людські NEC14 ксенотрансплантатні пухлини виростили в безтимусних мишей до запущеної стадії. Протипухлинну терапію РЕВ (цисплатин, етопозид і блеоміцин) і IMAB027 починали на 13 день. Мишам у режимі лікування РЕВ внутрішньочеревино вводили 1 мг/кг цисплатину й 5 мг/кг етопозиду в дні 13, 14, 15, 16 і 17 і 10 мг/кг блеоміцину в дні 13, 17 і 21. Антитіло IMAB027 вводили три рази на тиждень, чергуючи i.v./i.p./i.p. ін'єкції в дозі 35 мг/кг із 13 дня до 101 дня після трансплантації. Групи з розріджувачем як контролем одержували розчин 0,9 % NaCl і буфер замість лікарської речовини. Загалом, постійний моніторинг мишей здійснювався протягом 220 днів. (A), (B) Кінетичні криві середнього росту пухлин (\pm SEM) у нелікованих мишей і мишей, лікованих IMAB027, РЕВ або РЕВ у комбінації з IMAB027. Стрілки показують час початку лікування (критерій множинного порівняння Данна: ***, $p < 0,001$). (C) Криві виживання нелікованих мишей і мишей, лікованих IMAB027, РЕВ або РЕВ у комбінації з IMAB027 (критерій Коксу-Мантеля: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). Розмір групи: n=14.

Фігура 17. Відносна афінність зв'язування й цитотоксичність IMAB027, IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE

(A) Зв'язування IMAB027, IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE вимірювали за допомогою проточно-цитометричного аналізу на OV90 клітинах, які ендогенно експресують CLDN6. (B) Криві доза-ефект зменшення життєздатності OV90 клітин, опосередкованого IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE. Пухлинні клітини інкубували протягом 72 годин з IMAB027-DM1 або IMAB027-vcMMAE. Зменшення життєздатності клітин визначали, використовуючи аналіз життєздатності на основі ХТТ. Точки на графіку (n=3 повторностей) показані у вигляді середнього \pm SD. MFI: середня інтенсивність флуоресценції.

Фігура 18. Протипухлинна дія кон'югатів IMAB027-DM1 на розвинені ксенотрансплантатні пухлини

Безтимусних мишей з розвиненими підшкірними людськими OV90 ксенотрансплантатними пухлинами лікували через 10 днів після трансплантації одноразовими внутрішньовенними ін'єкціями в дозі 1,78, 5,33 або 16 мг/кг IMAB027-DM1 або розчинником як контролем. Розмір підшкірних пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM). Розмір групи: n=5, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Фігура 19. Визначення діапазону доз кон'югатів IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE при використанні на розвинених OV90 ксенотрансплантатних пухлинах

Безтимусних мишей з розвиненими підшкірними людськими OV90 ксенотрансплантатними пухлинами лікували через 10 днів після приживлення одноразовою внутрішньовенною ін'єкцією IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE, розріджувачем або ін'єкціями повторних доз IMAB027. (A) Ріст пухлин у мишей, оброблених 1,33, 2,67 або 5,33 мг/кг IMAB027-DM1 i.v. (вгорі) або 4, 8 або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE i.v. (внизу) у порівнянні з розчинником, який використовують як контроль й IMAB027 (35 мг/кг, щотижня i.v./i.p./i.p.). Розмір підшкірних пухлин вимірювали два рази на тиждень (середнє + SEM). (B) Криві Каплана-Мейера виживання мишей, яких лікували розріджувачем або 4, 8 або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму 1400 мм³, або якщо на пухлинах з'являлись виразки. Розмір групи: n=10, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Фігура 20. Визначення діапазону доз кон'югатів IMAB027-vcMMAE при використанні на розвинених PA-1 ксенотрансплантатних пухлинах

Безтимусних мишей з розвиненими підшкірними людськими PA-1 ксенотрансплантатними пухлинами лікували через 15 днів після трансплантації одноразовою внутрішньовенною ін'єкцією IMAB027-vcMMAE, розріджувача, який використовували як контроль або ін'єкціями повторних доз IMAB027. (A) Середній ріст пухлини (\pm SEM) і (B) криві Каплана-Мейера виживання мишей, яких лікували розріджувачем-контролем, IMAB027 (35 мг/кг, щотижня i.v./i.p./i.p.) або 4, 8 або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму 1400 мм³, або якщо на пухлинах з'являлись виразки. Розмір групи: n=8, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

$p < 0,01$. (C) Характерне імуногістохімічне фарбування для CLDN6 зрізів PA-1 ксенотрансплантатної пухлини в різні моменти часу після приживання.

Фігура 21. Протипухлинна дія IMAB027-vcMMAE на запущені MKN74 ксенотрансплантатні пухлини

Безтимусних мишей з розвиненими підшкірними людськими MKN74 ксенотрансплантатними пухлинами лікували через 7 днів після приживлення внутрішньовенною ін'єкцією 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE або розріджувачем, який використовували як контроль. (A) Середній ріст пухлини (\pm SEM) і (B) криві виживання Каплана-Мейера мишей, яких лікували розріджувачем або IMAB027-vcMMAE. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму 1400 мм³, або якщо на пухлинах з'являлись виразки. Розмір групи: $n=10$. (C) Проточний цитометричний аналіз експресії CLDN6 на пухлинних клітинах MKN74 до приживання й характерне імуногістохімічне фарбування нелікованої MKN74 ксенотрансплантатної пухлини на 31 день після приживлення. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Фігура 22. Протипухлинна дія IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE на розвинені внутрішньоочеревинні метастатичні пухлини яєчника людини

Безтимусним мишам внутрішньоочеревинно трансплантували клітини карциноми яєчника людини PA-1(Luc), які ектопічно експресують люциферазу. Після утворення внутрішньоочеревинних метастатичних ксенотрансплантатних пухлин тварин лікували дозою 16 мг/кг IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE або розріджувачем, який використовують як контроль, за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції на 14 день після трансплантації. Ріст метастазів визначали після введення люциферину за активністю люмінесценції, використовуючи систему візуалізації IVIS Lumina. (A) Кількісне визначення метастатичного навантаження в мишей, лікованих IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE або розріджувачем. (B) Люмінесцентна візуалізація *in vivo* усього тіла безтимусних мишей на 28 день після трансплантації. Розмір групи: $n=8$ (розріджувач) або $n=9$ (IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE), **: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$.

Фігура 23. Ендоцитоз CLDN6-зв'язаних антитіл клітинами карциноми людини

Ендоцитоз CLDN6-зв'язаних IMAB027, chimAB5F2D2 або ізотипових контрольних антитіл визначали, використовуючи аналіз на основі цитотоксичності, який залежить від коінтерналізації мішень-зв'язаних антитіл і кон'югованого із сапоніном Fab-фрагмента проти IgG людини (FabZap). PA-1, OV90 або NEC14 клітини карциноми людини інкубували протягом 72 годин з IMAB027, chimAB5F2D2 або ізотиповими контрольними антитілами й антилюдиною Fabzap. (A) Криві доза-ефект опосередкованого IMAB027/Fabzap і chimAB5F2D2/Fabzap зменшення життєздатності PA-1, OV90 і NEC14 клітин, відповідно. Точки на графіку ($n=3$ повтору) показані як середнє \pm SD. (B) Порівняння нормованого значення EC₅₀ IMAB027 (відносне EC₅₀) і максимуму (відносний максимум) проточно-цитометричного зв'язування й ендоцитоза.

Докладний опис винаходу

Незважаючи на те, що даний винахід докладно описаний далі, зрозуміло, що цей винахід не обмежується конкретними методиками, протоколами й реагентами, описаними тут, оскільки вони можуть відрізнятися. Також слід розуміти, що використана в описі термінологія призначена тільки для опису окремих варіантів здійснення й не повинна обмежувати обсяг даного винаходу, який буде обмежуватися тільки прикладеними пунктами формули винаходу. Якщо не зазначено іншого, усі технічні й наукові терміни, використані в описі, мають ті ж самі значення, які звичайно зрозумілі пересічному фахівцеві в даній галузі техніки.

Далі будуть описані елементи даного винаходу. Ці елементи перераховані в конкретних варіантах здійснення, однак, повинно бути зрозумілим, що вони можуть поєднуватися будь-яким чином і в будь-якій кількості для створення додаткових варіантів здійснення. Різним чином описані приклади й кращі варіанти здійснення не повинні тлумачитися як такі, що обмежують даний винахід тільки точно описаними варіантами здійснення. Слід розуміти, що цей опис підтримує й розглядає варіанти здійснення, які поєднують точно описані варіанти здійснення з будь-яким числом розкритих і/або кращих елементів. Більше того, будь-які перестановки й комбінації всіх описаних елементів у цій заявці слід розглядати як розкриті описом даної заявки, якщо контекст не диктує іншого.

Бажано, використані в описі терміни визначаються так, як описано в "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, і H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

При здійсненні на практиці даного винаходу використовуються, якщо не зазначено іншого, звичайні методи хімії, біохімії, клітинної біології, імунології й методи рекомбінантних ДНК, які пояснюються в літературі, присвяченій даній галузі техніки (дивися, наприклад, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Протягом всього докладного опису й наступних пунктів формули винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, слід розуміти, що слово "містить" і його варіанти, такі як "включає" і "утримує", припускає включення певного члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій, а не виключення будь-якого іншого члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій, хоча в деяких варіантах здійснення такий інший член, ціле число або стадія або група членів, цілих чисел або стадій може виключатися, тобто об'єкт винаходу полягає у включенні встановленого члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій. Слова "a" і "an" і "the" та подібні, які використовуються в контексті опису винаходу (особливо в контексті формули винаходу) слід тлумачити як такі, що включають і однину й множину, якщо в описі не зазначено іншого або інше явно не продиктоване контекстом. Перерахування меж значень в описі служить тільки як спосіб скорочення згадування окремо кожного окремого значення, яке попадає в межі. Якщо не зазначене інше, кожне конкретне значення включається в докладний опис так, ніби воно було окремо перераховане в описі. Усі описані тут методи можуть здійснюватися в будь-якому придатному порядку, якщо в описі не зазначено іншого або це іншим способом явно не суперечить контексту. Використання всіх без винятку прикладів або характерних виразів (наприклад, "такий як"), які уживаються в описі, покликані тільки краще ілюструвати винахід й не обмежує рамки винаходу, заявлені в іншій формі. Формулювання докладного опису не повинні тлумачитись як такі, що позначають який-небудь незаявлений елемент, істотний для здійснення винаходу на практиці.

Протягом тексту даної заявки процитовано кілька документів. Кожний з наведених в описі документів (включаючи всі патенти, патентні заявки, наукові публікації, специфікації виробника, інструкції тощо), як вище, так і нижче, повністю включаються в опис як посилання. Ніщо в описі не слід розглядати як допущення, що винахід не має права датувати таке розкриття з огляду на попередній винахід.

Клаудини є родиною білків, які є найбільш важливими компонентами щільних контактів, де вони створюють трансклітинний бар'єр, який контролює потік молекул у міжклітинному просторі між клітинами епітелію. Клаудини є трансмембранними білками, які перетинають мембрану 4 рази, при цьому й N-кінець і C-кінець розташовуються в цитоплазмі. Перша позаклітинна петля, яка називається EC1 або ECL1, складається в середньому з 53 амінокислот і друга позаклітинна петля, яка називається EC2 або ECL2, складається приблизно з 24 амінокислот. Білки клітинної поверхні родини клаудинів, такі як CLDN6, експресуються в пухлинах різного походження й, зокрема, можуть бути використані як цільові структури при використанні антитіло-опосередкованої імунотерапії рака внаслідок їхньої селективної експресії (експресія відсутня в токсикологічно релевантній нормальній тканині) і локалізації в плазматичній мембрані.

Установлено, що CLDN6 диференційно експресується в пухлинних тканинах, причому єдиною нормальною тканиною, яка експресує CLDN6, є плацента, у якій низькі кількості CLDN6 виявляються на рівні РНК. Було виявлено, що CLDN6 експресується, наприклад, у випадку раку яєчника, раку легенів, раку шлунка, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, меланому, раку голови й шиї, саркоми, раку жовчовивідних шляхів, нирково-клітинного раку й раку сечового міхура.

У різних варіантах здійснення винаходу ракові захворювання, пов'язані з експресією CLDN6, включають рак яєчника, зокрема, аденокарциному яєчника й тератокарциному яєчника, рак легенів, включаючи дрібноклітинний рак легенів (SCLC) і недрібноклітинний рак легенів (NSCLC), зокрема, плоскоклітинну карциному легенів і аденокарциному, рак шлунка, рак молочної залози, рак печінки, рак підшлункової залози, рак шкіри, зокрема, базальноклітинну карциному й плоскоклітинну карциному, злоякісну меланому, рак голови й шиї, зокрема, злоякісну плеоморфну аденому, саркому, зокрема, синовіальну саркому й карциносаркому, рак жовчних протоків, рак сечового міхура, зокрема, перехідно-клітинну карциному й папілярну карциному, рак нирок, зокрема, нирково-клітинну карциному, включаючи світлоклітинний рак нирок й папілярний рак нирок, рак товстої кишки, рак тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема, аденокарциному тонкої кишки й аденокарциному клубової кишки, тестикулярну ембріональну карциному, плацентарну хоріокарциному, рак шийки матки, рак яєчка, зокрема, тестикулярну семіному, тестикулярну тератому, ембріональний рак яєчка, рак матки, герміногенні пухлини, такі як тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема, герміногенні пухлини яєчка та їх метастатичні форми. В одному варіанті здійснення ракову хворобу, пов'язану з експресією CLDN6, вибирають із групи, яка складається з раку яєчника, рака легенів, метастатичного раку яєчника й метастатичного раку легенів. Бажано, рак яєчника є карциномою або аденокарциномою. Бажано, рак легенів є карциномою або аденокарциномою, і переважно є бронхіолярним раком, таким як бронхіолярна карцинома або бронхіолярна аденокарцинома.

Використаний в описі термін "CLDN" позначає клаудин і включає CLDN6. Бажано, клаудин є людським клаудином.

Термін "CLDN6" переважно має відношення до людського CLDN6 і, зокрема, до білка, який містить переважно амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 з переліку послідовностей або варіант амінокислотної послідовності. Перша позаклітинна петля CLDN6 бажано містить амінокислоти від 28 до 80, краще амінокислоти від 28 до 76 амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO: 1, або амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO: 2. Друга позаклітинна петля CLDN6 бажано містить амінокислоти які 138 до 160, бажано амінокислоти від 141 до 159, ще краще амінокислоти від 145 до 157 амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO: 1, або амінокислотної послідовності, зазначеної в SEQ ID NO: 2. Зазначені перша й друга позаклітинні петлі бажано утворюють позаклітинну ділянку CLDN6.

Термін "варіант" згідно з винаходом має відношення, зокрема, до мутантів, сплайс-варіантів, конформацій, ізоформ, алельних варіантів, видових варіантів і видових гомологів, зокрема тих, які присутні в природі. Алельний варіант має відношення до зміни в нормальній послідовності гена, значення якої часто є незрозумілим. Повне генетичне секвенування часто встановлює численні алельні варіанти для даного гена. Видовий гомолог є нуклеїновою кислотою або амінокислотною послідовністю, джерелом походження якої є інший вид, ніж у даної нуклеїновокислотної або амінокислотної послідовності. Термін "варіант" включає будь-які посттрансляційно модифіковані варіанти й конформаційні варіанти.

Згідно з винаходом термін "клаудин-позитивний рак" або подібні терміни означають рак, який містить ракові клітини, які експресують клаудин, бажано на поверхні зазначених ракових клітин. CLDN6 експресується на поверхні клітин, якщо він розташовується на поверхні зазначених клітин і є доступним для зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітин.

Термін "поверхня клітини" використовується відповідно до його звичайного значення в даній галузі, і таким чином позначає зовнішню поверхню клітини, доступну для зв'язування з білками й іншими молекулами. Наприклад, трансмембранний білок, який має одну або більше позаклітинних ділянок, розглядається як експресований на клітинній поверхні.

Термін "позаклітинна ділянка" у контексті даного винаходу відноситься до частини молекули, наприклад, білка, яка обернена до позаклітинного простору клітини й бажано є доступною із зовнішньої частини зазначеної клітини, наприклад, для антиген-з'єднувальних молекул, таких як антитіла, розташовані із зовнішнього боку клітини. Бажано, термін відноситься до однієї або більше позаклітинних петель або доменів або їх фрагментів.

Терміни "частина" або "фрагмент" використовуються в описі як взаємозамінні, та мають відношення до безперервного елемента. Наприклад, частина структури, такої як амінокислотна послідовність або білок, відноситься до безперервного елемента зазначеної структури. Ділянка, частина або фрагмент структури переважно має одну або більше функціональні властивості зазначеної структури. Наприклад, ділянка, частина або фрагмент епітопа або пептиду бажано є імунологічно еквівалентним епітопу або пептиду, з якого він отриманий. Частина або фрагмент білкової послідовності бажано містить послідовність, щонайменше, з 6, зокрема, щонайменше, 8, щонайменше, 10, щонайменше, 12, щонайменше, 15, щонайменше, 20, щонайменше, 30, щонайменше, 50, або щонайменше, 100 послідовних амінокислот послідовності білка.

Згідно з винаходом, CLDN6 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії є нижчим ніж у клітинах плаценти або в тканині плаценти. Бажано, рівень експресії становить менше, ніж 10 %, бажано, менше ніж 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05 % від експресії в клітинах плаценти або в тканині плаценти або навіть нижче. Бажано, CLDN6 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від плаценти не більше ніж в 2 рази, бажано в 1,5 рази й, бажано, не перевищує рівень експресії в зазначеній нераковій тканині. Бажано, CLDN6 незначно експресується у клітині, якщо рівень експресії нижчий від межі виявлення, і/або рівень експресії є занадто низьким для здійснення зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітин.

Згідно з винаходом CLDN6 експресується в клітині, якщо рівень експресії перевищує рівень експресії в нераковій тканині, відмінній від плаценти, бажано більше ніж в 2 рази, краще в 10 разів, 100 разів, 1000 разів або 10000 разів. Бажано, CLDN6 експресується в клітині, якщо рівень експресії є вищим від межі виявлення й/або якщо рівень експресії є досить високим для здійснення зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітин. Бажано, CLDN6, експресований у клітині, експресується або "виставляється" на поверхні зазначеної клітини.

Було виявлено, що експресія CLDN6 виявляється тільки в плаценті у вигляді мРНК, тоді як білок не виявляється зовсім. Відповідно, у даному документі приймається, що експресія CLDN6

у плаценті бажано співрозмірна з експресією мРНК.

Згідно з винаходом термін "хвороба" відноситься до будь-якого патологічного стану, включаючи рак, зокрема, до описаних у даному документі форм рака. Будь-які згадування раку або конкретні форми раку в даному документі також включають його метастази. У кращому

варіанті здійснення хвороба, яку необхідно лікувати відповідно до даної заявки, стосується клітин, які експресують CLDN6, зокрема, це ракові стовбурові клітини, які експресують CLDN6.

"Хвороби, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN6" або подібні вирази означають згідно з винаходом, що CLDN6 експресується в клітинах хворої тканини або органа. В одному варіанті здійснення експресія CLDN6 у клітинах хворої тканини або органа є підвищеною в порівнянні зі станом у здоровій тканині або органі. Підвищення передбачає збільшення, щонайменше, на 10 %, зокрема, щонайменше, на 20 %, щонайменше, на 50 %, щонайменше, на 100 %, щонайменше, на 200 %, щонайменше, на 500 %, щонайменше, на 1000 %, щонайменше, на 10000 % або навіть більше. В одному варіанті здійснення експресія виявляється тільки в ураженій тканині, тоді як експресія в здоровій тканині є пригніченою. Згідно з винаходом хвороби, пов'язані із клітинами, які експресують CLDN6, включають ракові захворювання.

Більше того, згідно з винаходом ракові захворювання переважно є такими, при яких ракові клітини експресують CLDN6.

При використанні в описі термін "ракова хвороба" або "рак" включає хворобу, яка характеризується неправильно регульованим клітинним ростом, проліферацією, диференціюванням, адгезією й/або міграцією. Під "раковою клітиною" розуміють аномальну клітину, яка росте за допомогою швидкої, неконтрольованої клітинної проліферації й продовжує рости після стимулу (впливу), який ініціює припинення нового росту. Бажано "ракова хвороба" характеризується клітинами, які експресують CLDN6, зокрема, раковими стовбуровими клітинами, які експресують CLDN6.

Термін "рак" згідно з винаходом включає лейкоз, семіному, меланому, тератому, лімфому, нейробластому, гліому, рак прямої кишки, рак ендометрію, рак нирок, рак надниркової залози, рак щитовидної залози, рак шкіри, рак головного мозку, рак шийки матки, рак шлунково-кишкового тракту, рак печінки, рак товстої кишки, рак шлунка, рак кишківника, рак голови й шиї, рак лімфатичного вузла, рак стравоходу, колоректальний рак, рак підшлункової залози, рак вуха, носа й горла (отоларінгологічний (ENT) рак), рак молочної залози, рак простати, рак матки, рак яєчника, рак легенів та їх метастази. Прикладами є карцинома легенів, карцинома молочної залози, карцинома простати, карцинома товстого кишківника, нирково-клітинна карцинома, карцинома шийки матки або метастази типів рака або пухлин, описаних вище. Термін "рак" згідно з винаходом також включає метастази раку.

Згідно з винаходом "карцинома" є злоякісною пухлиною, джерелом походження якої є епітеліальні клітини. Ця група представляє найпоширеніші форми раку, включаючи звичайні форми раку молочної залози, простати, легенів і товстого кишківника.

"Аденокарцинома" є раком, що виникає в залозистій тканині. Ця тканина до того ж є частиною великої групи тканин, відомих як епітеліальна тканина. Епітеліальна тканина включає шкіру, залози й цілий ряд інших тканин, що вистилають порожнини й органи тіла. З погляду ембріології епітелій походить із ектодерми, ендодерми й мезодерми. Щоб відноситися до аденокарциноми, клітини необов'язково повинні бути частиною залози, якщо тільки вони мають секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати в деяких вищих тварин, включаючи людей. Добре диференційовані аденокарциноми мають тенденцію походити на залозисту тканину, з якої вони походять, у той час як погано диференційовані не схожі на цю тканину. За допомогою фарбування клітин з біопсійного матеріалу патолог визначає, чи є пухлина аденокарциномою або іншим типом рака. Аденокарциноми можуть виникати в багатьох тканинах організму внаслідок повсюдного поширення залоз в організмі. Поряд з тим, що кожна залоза не може секретувати ту саму речовину, коли в клітині існує зовнішньосекреторна функція, вона вважається залозистою, і тому її злоякісна форма називається аденокарциномою. Злоякісні аденокарциноми вторгаються в інші тканини й дають метастази, які також проникають в інші тканини. Аденокарцинома яєчника є найпоширенішим типом карциноми яєчника. Сюди включаються серозні й слизові аденокарциноми, світлоклітинна аденокарцинома й ендометріїдна аденокарцинома.

Під "метастазуванням" слід розуміти поширення ракових клітин з первинного місця утворення в іншу частину організму. Утворення метастазу є дуже складним процесом і залежить від відділення злоякісних клітин від первинної пухлини, інвазії позаклітинного матрикса, проникності ендотеліальних базальних мембран для проникнення в порожнину тіла й судин, а потім, після транспортування кровотоком, інфільтрації органів-мішеней. Нарешті, ріст нової пухлини в місці-мішені залежить від ангиогенеза. Метастази пухлини можуть виникати навіть

після видалення первинної пухлини, тому що пухлинні клітини або компоненти можуть залишитися й розвинути метастатичний потенціал. В одному варіанті здійснення термін "метастази" відповідно до винаходу відноситься до "віддалених метастазів", тобто метастазів, відділених від первинної пухлини й системи регіональних лімфатичних вузлів. В одному варіанті здійснення термін "метастази" відповідно до винаходу відноситься до метастазів в лімфатичний вузол.

Резистентний рак – це злоякісне новоутворення, у відношенні якого певне лікування є неефективним, який або початково нечутливим до лікування, або який стає нечутливим із часом. Терміни "рефрактерний", "нечутливий" або "резистентний" використовуються в описі як взаємозамінні.

Використаний в описі термін "ракова стовбурова клітина" має відношення до клітини, яка може бути попередником високо проліферативної ракової клітини. Ракова стовбурова клітина має здатність поновлювати ріст пухлини, що продемонстровано її здатністю утворювати пухлини в мишей з порушенням імунітетом. Ракові стовбурові клітини в більшості випадків є повільно зростаючими у порівнянні із загальною масою пухлини, тобто ракові стовбурові клітини зазвичай перебувають у стані спокою. У деяких варіантах здійснення, але не в усіх, ракові стовбурові клітини можуть представляти тільки частину пухлини, наприклад, приблизно від 0,1 до 10 %. Ракові стовбурові клітини можуть мати одну або більше або всі з поміж наступних характеристик або властивостей: (i) можуть мати приховану здатність ініціювати виникнення пухлини й/або відновлювати ріст пухлин, (ii) можуть бути менш мутованими у порівнянні із загальною масою пухлини (наприклад, внаслідок більш повільного росту й у такий спосіб меншої кількості помилок, які залежать від реплікації ДНК, кращої репарації ДНК і/або епігенетичних/немутагенних змін, які сприяють їх злоякісності), (iii) можуть мати кілька характерних особливостей (а) нормальної стовбурової клітини(н) (наприклад, подібний профіль поверхневих антигенів і/або внутрішньоклітинної експресії, програми самовідновлення, множинну лікарську резистентність, незрілий фенотип тощо, типові для нормальних стовбурових клітин) і можуть походити від (а) нормальної стовбурової клітини(н), (iv) можуть бути джерелом утворення метастазів, (v) можуть бути повільно зростаючими або перебувати в стані спокою, (vi) можуть бути туморогенними (наприклад, як встановлено за допомогою експериментів з NOD/SCID імплантацією), (vii) можуть бути відносно резистентними до традиційної терапії (тобто хеморезистентними) і (viii) можуть містити субпопуляцію пухлин (наприклад, у порівнянні із загальною масою пухлини).

Під терміном "лікувати" слід розуміти введення суб'єктові сполуки або композиції або комбінації сполук або композицій з метою запобігання або усунення хвороби, включаючи зменшення розмірів пухлини або кількості пухлин у суб'єкта; затримку або уповільнення хвороби в суб'єкта; інгібування або уповільнення розвитку нової хвороби в суб'єкта; зменшення частоти й тяжкості симптомів і/або рецидивів у суб'єкта, який має в цей час або, який раніше мав захворювання; і/або подовження, тобто збільшення тривалості життя суб'єкта. Зокрема, термін "лікування хвороби" включає лікування, зменшення тривалості, полегшення, запобігання, уповільнення або інгібування прогресування або погіршення, або запобігання або затримку початку хвороби або її симптомів.

У контексті даного винаходу терміни "захищати" або "запобігати" відносяться до запобігання або лікування або до того й іншого виникнення й/або розвитку хвороби в суб'єкта, зокрема, до зведення до мінімуму можливості того, що в суб'єкта буде розвиватися хвороба, або до затримки розвитку хвороби. Наприклад, суб'єкт, який піддається ризику появи рака, може бути кандидатом на лікування з метою запобігання рака.

Вираз "той, що має ризик" позначає суб'єкт, який має більш високий, ніж звичайно, шанс розвитку хвороби, зокрема, рака, у порівнянні з основною популяцією. Крім того, суб'єкт, який мав або який на даний час має хворобу, зокрема, рак, є суб'єктом з підвищеним ризиком розвитку хвороби, оскільки хвороба в суб'єкта може продовжувати розвиватися. У суб'єктів, які мають рак на даний час або які мали рак також існує підвищений ризик утворення метастазів рака.

Згідно з винаходом термін "пацієнт" позначає суб'єкта, який потребує лікування, зокрема, хворого суб'єкта, включаючи людей, нелюдиноподібних приматів або інших тварин, зокрема, ссавців, таких як корови, коні, свині, вівці, кози, собаки, кішки, або гризунів, таких як миші й пацюки. В найкращому варіанті здійснення пацієнт є людиною.

Використаний в описі термін "комбінація" у контексті застосування терапії відноситься до використання більш ніж одного виду лікування або терапевтичного засобу. Використання терміна "у комбінації" не обмежує порядок, у якому терапія або терапевтичні засоби вводяться суб'єктові. Терапія або терапевтичний засіб може бути введеним до, одночасно з або після

введення суб'єктові іншого виду терапії або терапевтичного засобу. Бажано, види терапії або терапевтичні засоби вводяться суб'єктові в такій послідовності, такій кількості й/або в межах такого інтервалу часу, що види терапії або терапевтичні засоби можуть діяти спільно. В окремому варіанті здійснення види терапії або терапевтичні засоби вводяться суб'єктові в такій послідовності, такій кількості й/або в межах такого інтервалу часу, що вони забезпечують більшу терапевтичну користь, ніж в тому випадку, коли вони вводяться інакше, зокрема, незалежно один від одного. Бажано, більша користь є синергійним ефектом.

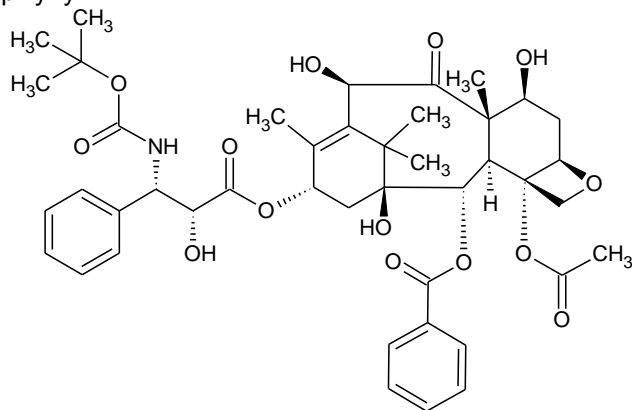
"Клітина-мішень" означає яку-небудь небажану клітину, таку як ракова клітина, зокрема, ракова стовбурова клітина. У кращих варіантах здійснення клітина-мішень експресує CLDN6.

Згідно з винаходом термін "хіміотерапія" має відношення до лікування з використанням одного або більше хіміотерапевтичних засобів або комбінацій хіміотерапевтичних засобів, таких як цитостатичні або цитотоксичні засоби. Хіміотерапевтичні засоби згідно з винаходом включають цитостатичні сполуки й цитотоксичні сполуки.

Згідно з винаходом термін "хіміотерапевтичний засіб" включає таксани, такі як паклітаксел і доцетаксел, і сполуки платини, такі як цисплатин і карбоплатин та їх комбінації. Кращі комбінації, зокрема, для лікування раку яєчника, можуть містити комбінацію таксану й сполуки платини, наприклад, комбінацію паклітакселу й карбоплатину. Крім того, кращі комбінації, зокрема, для лікування раку яєчника, зокрема, герміногенних пухлин яєчника, і/або для лікування ембріонально-клітинних пухлин, зокрема, рака яєчника й пухлин статевих клітин яєчка, можуть включати комбінацію сполуки платини, такої як цисплатин з етопозидом і/або блеомицином. Згідно з винаходом посилення на хіміотерапевтичний засіб включає будь-які проліки, такі як складний ефір, сіль або похідні, наприклад, кон'югат зазначеного засобу. Прикладами є кон'югати зазначеного засобу з речовиною-носієм, наприклад, паклітаксел, пов'язаний із протеїном, наприклад, паклітаксел, пов'язаний з альбуміном. Бажано, солі зазначеного засобу є фармацевтично прийнятними солями.

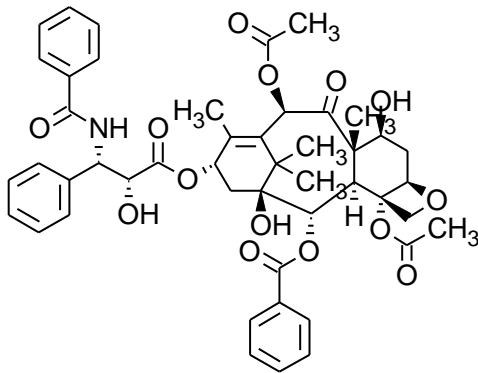
Таксани – це клас дитерпенових сполук, отриманих початково з природних джерел, наприклад, рослин роду *Taxus*, а деякі з них були синтезовані штучно. Основним механізмом дії лікарських засобів із класу таксанів є порушення функції мікротрубочок, що призводить до інгібування процесу поділу клітин. Таксани включають доцетаксел (таксотер) і паклітаксел (таксол).

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



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

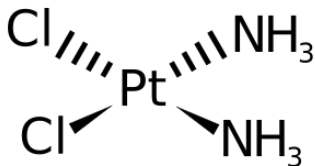
Відповідно до винаходу термін "паклітаксел" відноситься до сполуки, яка має наступну формулу:



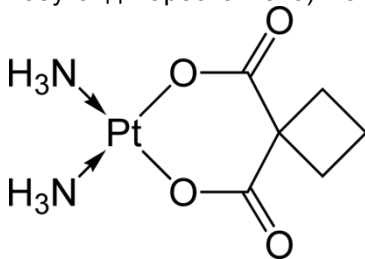
Зокрема, термін "паклітаксел" відноситься до сполуки (2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-біс-(ацетилокси)-13-[[2R, 3S)-3-(бензоіламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси]-1,7-дигідрокси-9-оксо-5,20-епоксатакс-11-ен-2-іл бензоат.

Відповідно до винаходу термін "сполуки платини" має відношення до сполук, що містять платину у своїх структурах, таким як платинові комплекси, і включає такі сполуки, як цисплатин, карбоплатин і оксалиплатин.

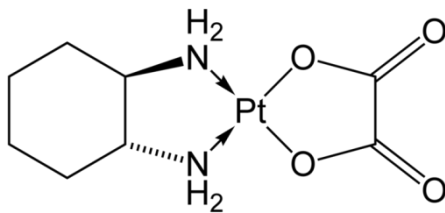
Термін "цисплатин" відноситься до сполуки цис-діамінодихлороплатини (II) (CDDP), яка має наступну формулу:



Термін "карбоплатин" відноситься до сполуки цис-діаміно(1,1-циклобутандикарбоксилато)платини (II), яка має наступну формулу:



Термін "оксалиплатин" відноситься до сполуки платини, у якому атом платини утворює комплекс із лігандом діаміноциклогексаном, дана сполука має наступну формулу:

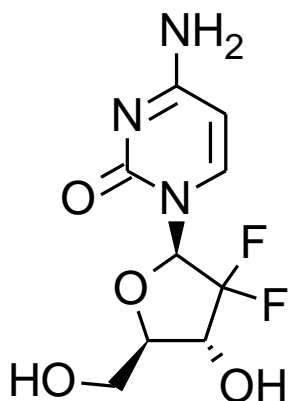


Зокрема, термін "оксалиплатин" відноситься до сполуки [(1R, 2R)-циклогексан-1,2-діамін](етандіоато-О, О')платини(II). Оксалиплатин для ін'єкцій також продається під торговельною назвою елоксатин.

Додаткові хіміотерапевтичні засоби, використання яких передбачається в даному винаході, або окремо або в комбінації з іншими хіміотерапевтичними засобами, такими як таксани або сполуки платини, включають, але не обмежуються цим, нуклеозидні аналоги, аналоги камптотецину й антрацикліни.

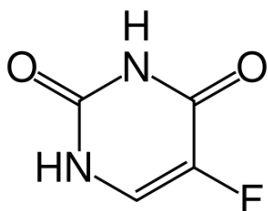
Термін "нуклеозидний аналог" відноситься до структурного аналога нуклеозида, ця категорія включає як аналоги пурину, так і аналоги піримідину.

Термін "гемцитабін" відноситься до сполуки, яка є нуклеозидним аналогом, що й має наступну формулу:



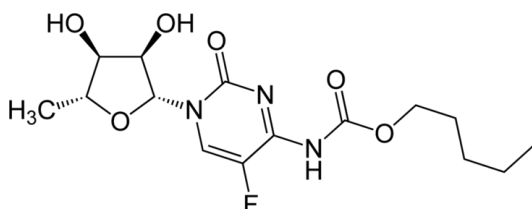
Зокрема, цей термін відноситься до сполуки 4-аміно-1-(2-дезоксидифтор-β-D-еритропентофуразоніл)піримідин-2(1H)-он або 4-аміно-1-[(2R, 4R, 5R)-3,3-дифтор-4-гідрокси-5-(гідроксиметил)оксолан-2-іл]-1,2-дигідропіридин-2-он.

- 5 Термін "нуклеозидний аналог" включає похідні фторпіримідину, такі як фторурацил і його проліки. Термін "фторурацил" або "5-фторурацил" (5-FU або f5U) (продається під торговою назвою "Адруцил", "Сагас", "Ефудикс", "Ефудекс" і "Флюороплекс") відноситься до сполуки, яка є аналогом піримідину і яка має наступну формулу:



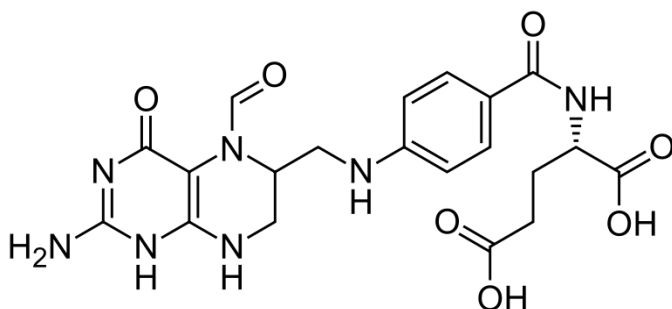
- 10 Зокрема, термін відноситься до сполуки 5-фтор-1H-піримідин-2,4-діон.

Термін "капецитабін" (Xeloda, Roche) відноситься до хіміотерапевтичного засобу, який є проліками, які перетворюються на 5-FU у тканинах. Капецитабін може вводитися перорально й має наступну формулу:



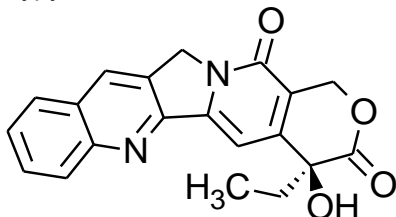
- 15 Зокрема, термін відноситься до сполуки пентил [1-(3,4-дигідрокси-5-метилтетрагідрофуран-2-іл)-5-фтор-2-оксо-1H-піримідин-4-іл]карбамат.

- 20 Термін "фолінова кислота" або "лейковорин" відноситься до сполуки, яка використовується в синергійній комбінації з хіміотерапевтичним препаратом 5-фторурацилом. Таким чином, якщо в описі зустрічається посилання на введення 5-фторурацилу або його проліків, зазначене введення в одному варіанті здійснення може включати введення в комбінації з фоліновою кислотою. Фолінова 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]бензоїл]аміно]пентандіова кислота.

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 містять наступну структуру:

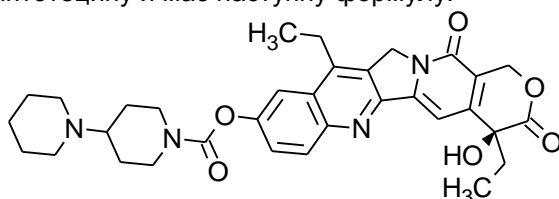


5

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

Іринотекан є лікарським засобом, який запобігає розкручуванню ДНК шляхом інгібування топоізомерази I. З погляду хімії, він є напівсинтетичним аналогом природного алкалоїду камптотецину й має наступну формулу:

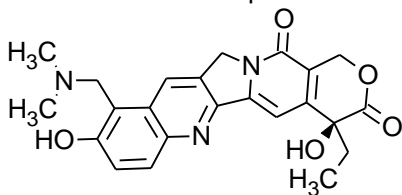
10



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

15

Топотекан є інгібітором топоізомерази й має наступну формулу:



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

20

Антрацикліни – це клас лікарських засобів, які звичайно використовуються у хіміотерапії пухлин, також відомий за назвою антрациклінових антибіотиків. У структурному відношенні всі антрацикліни мають загальну структуру, яка містить чотири кільця 7,8,9,10-тетрагідротетрацен-5,12-хінону й звичайно потребують глікозилування в специфічних сайтах.

25

Антрацикліни переважно мають один або більше з поміж наступних механізмів дії: 1. Інгібування синтезу ДНК і РНК шляхом інтеркаляції між парами основ ДНК/РНК ланцюжка, що запобігає реплікації швидкоростучих ракових клітин. 2. Інгібування ферменту топоізомерази II, що запобігає релаксації суперспіральної ДНК і в такий спосіб блокує транскрипцію й реплікацію ДНК. 3. Утворення залізо-опосередкованих вільних кисневих радикалів, які пошкоджують ДНК і мембрани клітин.

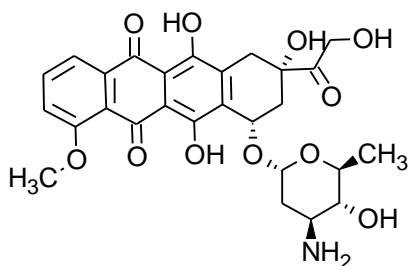
30

Відповідно до винаходу термін "антрациклін" переважно має відношення до препарату, переважно протипухлинного препарату, призначеного для індукції апоптоза, переважно шляхом інгібування повторного зв'язування ДНК із топоізомеразою II.

Приклади антрациклінів і аналогів антрациклінів включають, але не обмежуються цим, даунорубіцин (дауноміцин), доксорубіцин (адриаміцин), епірубіцин, ідарубіцин, родоміцин, пірарубіцин, валрубіцин, N-трифтор-ацетил доксорубіцин-14-валерат, аклаціноміцин, морфолінодоксорубіцин (морфоліно-DOX), ціаноморфоліно-доксорубіцин (ціаноморфоліно-DOX), 2-піроліно-доксорубіцин (2-PDOX), 5-імінодауноміцин, мітоксантрон і аклаціноміцин А (акларубіцин). Мітоксантрон є членом класу антрацендіонів, аналогів антрациклінів, антрациклінів, які втратили цукровий компонент, але які зберегли плоску поліциклічну структуру ароматичних кілець, яка забезпечує можливість інтеркаляції в ДНК.

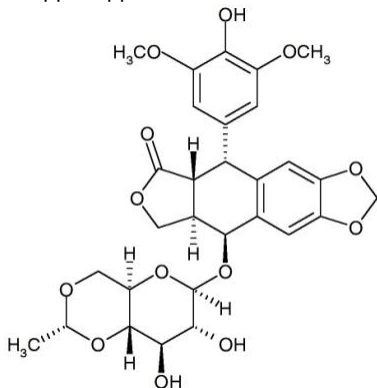
40

Зокрема, епірубіцин в контексті даного винаходу передбачено як антрациклін. Епірубіцин є антрацикліновим препаратом, який має наступну формулу:



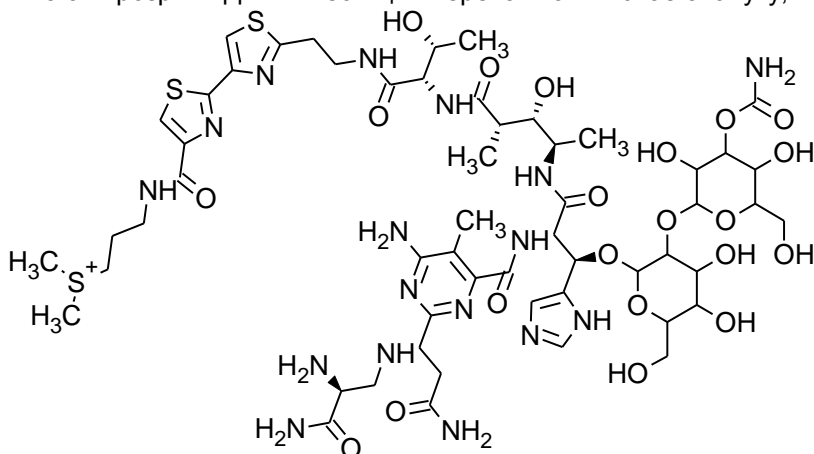
і продається під торговельною назвою "елленс" у США й під торговельною назвою "фарморубіцин" або "епірубіцин" (Ebewe) в інших країнах. Зокрема, термін "епірубіцин" відноситься до сполуки (8R, 10S)-10-[(2S, 4S, 5R, 6S)-4-аміно-5-гідрокси-6-метил-оксан-2-іл]окси-6,11-дигідрокси-8-(2-гідроксиацетил)-1-метокси-8-метил-9,10-дигідро-7H-тетрацен-5,12-діон. Епірубіцин є більш бажаним у деяких хіміотерапевтичних режимах у порівнянні з доксорубіцином, найбільш популярним антрацикліном, тому що, очевидно, він викликає менше побічних ефектів.

Термін "етопозид" відноситься до напівсинтетичного похідного подофілотоксина, який демонструє протипухлинну активність. Етопозид інгібує синтез ДНК шляхом утворення комплексу між топоізомеразою II і ДНК. Цей комплекс викликає появу розривів у дволанцюговій ДНК і перешкоджає їхній репарації за допомогою зв'язування з топоізомеразою II. Нагромадження розривів у ДНК перешкоджає входу клітини в мітотичну фазу розподілу й призводить до загибелі клітини. Етопозид має наступну формулу:



Зокрема, термін відноситься до сполуки 4'-диметил-епіподофілотоксин 9-[4,6-O-(R)-етиліден-бета-D-глюкопіранозид], 4'-(дигідроген фосфат).

Термін "блеоміцин" відноситься до глікопептидного антибіотику, який продукується бактерією *Streptomyces verticillus*. При використанні його як протипухлинного засобу, він діє, викликаючи розриви ДНК. Блеоміцин переважно включає сполуку, яка має наступну формулу:



Якщо згідно з винаходом хіміотерапія вводиться в комбінації з антитілом, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6 (яке може бути присутнім у кон'югаті, щонайменше, з однією молекулою токсичного лікарського засобу, тобто у вигляді кон'югата антитіло-лікарський засіб), у такому випадку більш бажаним є введення хіміотерапії до й/або одночасно із введенням антитіла (у вигляді суміші або окремих композицій). Бажано, введення хіміотерапії починається до введення антитіла. Бажано, хіміотерапія збільшує експресію CLDN6 у ракових клітинах, таких як

ракові стовбурові клітини, причому хіміотерапію починають або вводять до введення антитіла, внаслідок чого протипухлинна активність антитіла збільшується. Бажано, введення хіміотерапії починається, щонайменше, за 2, щонайменше, за 4, щонайменше, за 6, щонайменше, за 8, щонайменше, за 10, щонайменше, за 12 або, щонайменше, за 14 днів до першого введення антитіла. Уведення хіміотерапії може тривати протягом введення антитіла або може бути припинене до або під час введення антитіла, наприклад, за 1-3, 1-7, 1-10 або 1-14 днів до введення антитіла. Бажано, хіміотерапевтичний засіб включає таксан, такий як паклітаксел або доцетаксел, і/або сполуки платини, такі як цисплатин або карбоплатин.

Термін "антиген" відноситься до такого агента, як білок або пептид, що містить епітоп, на який спрямована або повинна бути спрямована імунна відповідь. У кращому варіанті здійснення антиген є пухлиноасоційованим антигеном, таким як CLDN6, тобто компонентом ракових клітин, який походить з цитоплазми, клітинної поверхні й клітинного ядра, зокрема, тих антигенів, які виробляються, бажано у великій кількості, внутрішньоклітинно або як поверхневі антигени на ракових клітинах.

У контексті даного винаходу термін "пухлиноасоційований антиген" переважно має відношення до білків, які за нормальних умов специфічно експресуються в обмеженому числі тканин і/або органів або під час конкретних стадій розвитку й експресуються або ненормально експресуються в одній або більше пухлинних або ракових тканинах. У контексті даного винаходу пухлиноасоційований антиген переважно пов'язаний із клітинною поверхнею ракової клітини й бажано не експресується або тільки вкрай рідко експресується в нормальних тканинах.

Термін "епітоп" відноситься до антигенної детермінанти в молекулі, тобто частини в молекулі, яка розпізнається імунною системою, наприклад, яка розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи є окремими, тривимірними ділянками на антигені, які розпізнаються імунною системою. Звичайно епітопи складаються з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні й неконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язування з першим, але не із другим, втрачається в присутності денатуруючих розчинників. Епітоп білка, такого як CLDN6, переважно містить безперервну або переривчасту частину зазначеного білка й містить бажано від 5 до 100, краще від 5 до 50, ще 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 містить, щонайменше, два важких (H) ланцюги й два легких (L) ланцюги, взаємо-з'єднані дисульфідними зв'язками, і включає будь-яку молекулу, яка містить антигензв'язувальну ділянку. Термін "антитіло" включає моноклональні антитіла й фрагменти або похідні антитіл, включаючи, без обмеження, людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, наприклад, scFv's і антигензв'язувальні фрагменти антитіл, такі як Fab і Fab¹ фрагменти, а також включає всі рекомбінантні форми антитіл, наприклад, антитіла, експресовані в прокаріотах, неглікозильовані антитіла й будь-які антигензв'язувальні фрагменти антитіл і похідні, які описуються тут. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (позначається в описі VH) і константної області важкого ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (позначається в описі VL) і константної області легкого ланцюга. Області VH і VL можна додатково розділити на області гіперваріабельності (підвищеної мінливості), які називаються гіперваріабельними ділянками (CDR), які чергуються з ділянками, які є більш консервативними, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, що розташовуються від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого й легкого ланцюга містять домен зв'язування, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканиною або факторами "хазяїна", включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітин) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Використаний в описі термін "моноклональне антитіло" відноситься до препарату молекул антитіл з однаковим молекулярним складом. Моноклональне антитіло має одну специфічність зв'язування й спорідненість до одного епітопу. В одному варіанті здійснення моноклональні антитіла виробляються за допомогою гібридоми, яка включає В-клітину, отриману від тварини, яка не є людиною, наприклад, миші, і з'єднану з іморталізованою клітиною.

Використаний в описі термін "рекомбінантне антитіло" включає всі антитіла, отримані, експресовані, створені або виділені за допомогою рекомбінантних способів, наприклад, (а) антитіла, виділені із тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною або трансхромосомною

відносно генів імуноглобулінів або гібридом, отриманих з них, (b) антитіла, виділені із клітини-хазяїна, трансформованої для того, щоб вона експресувала антитіла, наприклад, із трансфектоми, (c) антитіла, виділені з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних антитіл, і (d) антитіла отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які стосуються сплайсинг послідовностей генів імуноглобулінів з іншими ДНК-послідовностями.

Використаний в описі термін "людське антитіло" включає антитіла, які мають варіабельну область і константну область, що походять з людських зародкових послідовностей імуноглобуліну. Людські антитіла можуть містити залишки амінокислот, неcodовані людськими зародковими послідовностями імуноглобуліну (наприклад, мутації, введені шляхом випадкового або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або шляхом соматичних мутацій *in vivo*).

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до молекули, яка має ділянку зв'язування антигену, отриману в основному від імуноглобуліну виду тварини, яка не є людиною, при цьому в основі іншої частини молекули імуноглобуліну знаходиться структура й/або послідовності імуноглобуліну людини. Ділянка зв'язування антигену може містити або повні варіабельні домени, приєднані до константних доменів, або тільки гіперваріабельні ділянки (CDR), приєднані до придатних каркасних ділянок у варіабельних доменах. Ділянки зв'язування антигену можуть бути дикого типу або модифікованими за допомогою однієї або більше амінокислотних замін, наприклад, модифікованими для того, щоб бути більш схожими на людський імуноглобулін. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають усі CDR-послідовності (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить усі шість CDR мишачого антитіла). Інші форми мають одну або більше CDR, змінених у порівнянні з первинним антитілом.

Термін "химерне антитіло" відноситься до антитіл, у яких одна частина кожної з амінокислотних послідовностей важкого й легкого ланцюгів є гомологічною до відповідних послідовностей в антитілі, отриманому від конкретного виду або такого, що належить до певного класу, тоді як інший сегмент ланцюга є гомологічним до відповідних послідовностей іншого виду. Звичайно варіабельна ділянка і легкого і важкого ланцюгів копіює варіабельні ділянки антитіл, отриманих від одного виду ссавців, тоді як константні частини є гомологічними до послідовностей антитіл, отриманих від іншого виду. Однією очевидною перевагою таких химерних форм є те, що варіабельну ділянку можна легко одержати з відомих на даний час джерел, використовуючи легкодоступні В-клітини або гібридами від організмів-хазяїнів, які не є людиною, у комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, із препаратів клітин людини. Притому, що варіабельна область має перевагу, яка полягає в легкості одержання, а на специфічність не впливає джерело, константна область, будучи людською, менш імовірно викличе імунну відповідь у людини при введенні антитіл, ніж викликала б константна область із джерела, яке не є людиною. Однак, дане визначення не обмежується цим окремим прикладом.

Джерелом походження антитіл можуть бути різні види, включаючи, але не обмежуючись цим, мишу, пацюків, кролика, морську свинку й людину.

Описані в даному документі антитіла включають IgA, такі як IgA1 або IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM і IgD антитіла. У різних варіантах здійснення антитіло є IgG1 антитілом, конкретніше IgG1, каппа або IgG1, лямбда ізотип (тобто IgG1, κ, λ), IgG2a антитіло (наприклад, IgG2a, κ, λ), IgG2b антитіло (наприклад, IgG2b, κ, λ), IgG3 антитіло (наприклад, IgG3, κ, λ) або IgG4 антитіло (наприклад, IgG4, κ, λ).

При використанні в описі "гетерологічне антитіло" визначається з погляду трансгенного організму, який продукує таке антитіло. Цей термін відноситься до антитіла, що має амінокислотну послідовність або кодується нуклеїновокислотною послідовністю, яка відповідає послідовності, виявленій в організмі, що не містить трансгенного організму, і як правило, отриманому від іншого виду, ніж трансгенний організм.

При використанні в описі "гетерогібридне антитіло" відноситься до антитіла, яке має легкий і важкий ланцюги різних організмів. Наприклад, антитіло, яке має людський важкий ланцюг, з'єднаний з мишачим легким ланцюгом, є гетерогібридним антитілом.

Описані тут антитіла переважно є ізольованими. "Ізольоване антитіло" при використанні в описі відноситься до антитіла, яке в основному є вільним від інших антитіл, що мають інші антигенні специфічності (наприклад, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN6, є в основному вільним від антитіл, які специфічно зв'язують антигени, відмінні від CLDN6). Однак, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом CLDN6 людини, може мати перехресну реактивність до інших споріднених антигенів, наприклад, від інших видів (наприклад, видових гомологів CLDN6). Більше того, ізольоване антитіло може бути в основному вільним від іншого клітинного матеріалу й/або хімічних речовин. В одному варіанті здійснення винаходу комбінація "ізольованих" моноклональних антитіл стосується антитіл, які мають різні специфічності й об'єднані у чітко визначену

композицію або суміш.

Терміни "антигензв'язувальна ділянка" антитіла (або просто "ділянка зв'язування") або "антигензв'язувальний фрагмент" антитіла (або просто "з'єднувальний фрагмент") або подібні терміни відносяться до одного або більше фрагментів антитіл, які зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Показано, що антигензв'язувальна функція антитіла може здійснюватися фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади з'єднувальних фрагментів, охоплені терміном "антигензв'язувальна ділянка" антитіла, включають (i) Fab фрагменти, одновалентні фрагменти, які складаються з VL, VH, CL і CH доменів; (ii) F(ab')₂ фрагменти, двовалентні фрагменти, які містять два Fab-фрагменти, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd фрагменти, які складаються з VH і CH доменів; (iv) Fv фрагменти, які складаються з VL і VH доменів одноланцюгових антитіл, (v) dab фрагменти (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546), які складаються з VH домена; (vi) ізольовані гіперваріабельні ділянки (CDR) і (vii) комбінації двох або більше ізольованих CDR, які необов'язково можуть з'єднуватися синтетичним лінкером. Крім того, хоча два домена Fv фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати, використовуючи рекомбінантні методи, за допомогою синтетичних лінкерів, що дає їм можливість утворювати єдиний білковий ланцюг, у якому VL і VH області розташовуються парами, щоб утворювати одновалентні 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. Додатковим прикладом є домен-з'єднувальні гібридні імуноглобуліни, які містять (i) поліпептидний домен зв'язування, який приєднується до шарнірної області імуноглобуліну, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до шарнірної області, і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до константної області CH₂. Зв'язувальний домен поліпептиду може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Домен-зв'язувальні імуноглобулінові гібридні білки додатково розкриваються в США 2003/0118592 і США 2003/0133939. Ці фрагменти антитіл одержують за допомогою звичайних методів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, при цьому фрагменти зазнають скринінгу відносно придатності, так само, як і інтактні антитіла.

Термін "домен зв'язування", у контексті даного винаходу, описує структуру, наприклад, антитіла, яка зв'язується з/взаємодіє з даною цільовою структурою/антигеном/епітопом. Таким чином, домен зв'язування у контексті даного винаходу позначає "ділянку (сайт) взаємодії з антигеном".

Винахід включає всі антитіла й похідні антитіл, такі як фрагменти антитіл, описані тут, які для цілей винаходу охоплюються терміном "антитіло". Термін "похідні антитіл" відноситься до будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад, кон'югату антитіла й іншого агента або антитіла або фрагмента антитіла.

Антитіла природного походження є, як правило, моноспецифічними, тобто вони зв'язуються з одним антигеном. Даний винахід включає антитіла, що зв'язуються із цільовою клітиною (шляхом взаємодії з CLDN6) і другою часткою, такою як цитотоксична клітина (наприклад, використовуючи CD3 рецептор). Антитіла даного винаходу можуть бути біспецифічними або мультиспецифічними, такими як триспецифічні, тетраспецифічні тощо.

Термін "біспецифічна молекула" включає будь-який агент, який має дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні, і (b) рецептором, таким як Fc-рецептор на поверхні ефektorної клітини. Термін "мультиспецифічна молекула" включає агент, який має більше ніж дві різні специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні й (b) з рецептором, таким як Fc-рецептор на поверхні ефektorної клітини й (c), щонайменше, з одним іншим компонентом. Відповідно, термін "антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6" включає, але не обмежується цим, біспецифічні, триспецифічні, тетраспецифічні й інші мультиспецифічні молекули, націлені на CLDN6, і на інші мішені, такі як Fc-рецептори на ефektorних клітинах. Термін "біспецифічні антитіла" також включає діатіла (діабоди). Діатіла є двовалентними біспецифічними антитілами, у яких VH і VL домени експресуються на одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є занадто коротким, щоб дати можливість розташовуватися парами між двома доменами на одному і тому ж ланцюзі, таким чином, змушуючи домени утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга й породжуючи два антигензв'язувальні ділянки (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).

У контексті даного винаходу "антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6," переважно

здатне викликати імунні ефекторні функції, як описано в цьому документі. Бажано, зазначені імунні ефекторні функції направляються проти клітин, таких як ракові стовбурові клітини, які несуть пухлиноасоційований антиген CLDN6 на своїй поверхні.

Термін "імунні ефекторні функції" у контексті даного винаходу включає будь-яку функцію, опосередковану компонентами імунної системи, яка призводить, наприклад, до інгібування росту пухлини й/або інгібування розвитку пухлини, включаючи інгібування дисемінації пухлини й метастазів. Бажано, імунні ефекторні функції в результаті призводять до знищення ракових клітин, зокрема, ракових стовбурових клітин. Такі функції включають комплементзалежну цитотоксичність (CDC), антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC), антитілозалежний клітинноопосередкований фагоцитоз (ADCP), індукцію апоптозу в клітинах, що несуть пухлиноасоційований антиген, цитоліз клітин, які несуть пухлиноасоційований антиген і/або інгібування проліферації клітин, що несуть пухлиноасоційований антиген. Зв'язувальні агенти також можуть впливати просто шляхом зв'язування пухлиноасоційованих антигенів на поверхні ракової клітини. Наприклад, антитіла можуть блокувати функцію пухлиноасоційованого антигену або викликати апоптоз тільки шляхом зв'язування з пухлиноасоційованим антигеном на поверхні ракової клітини.

Відповідно до винаходу, антитіло може бути кон'югованим з терапевтичною молекулою або агентом, таким як, токсичний фрагмент (молекула) лікарського засобу, зокрема, цитотоксином, лікарським засобом (наприклад, імуносупресорним засобом) або радіоізотопом. Цитотоксин або цитотоксичний засіб включає будь-який засіб, який завдає шкоду й, зокрема, знищує клітини. Приклади включають таксол, цитохалазин В, граміцидин D, етидіум бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкрисин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксиантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лидокаїн, пропранолол і пуроміцин та їх аналоги або гомологи. Придатні для утворення кон'югатів з антитілами терапевтичні засоби включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогuanін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил декарбазин), алкілюючі засоби (наприклад, мехлоретамін, тіотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломусти (CCNU), циклофосфамід, бусульфат, дибромманітол, стрептозотоцин, мітоміцин C і цис-дихлородиамін платини (II) (DDP) цисплатин), антрацикліни (наприклад, даунорубіцин (у минулому даунорубіцин) і доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (у минулому актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (AMC), і антимітотичні засоби (наприклад, вінкрисин і вінбластин). У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є цитотоксичним засобом або радіотоксичним засобом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є імуносупресорним засобом. В іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є GM-CSF. У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є доксорубіцином, цисплатином, блеоміцином, сульфатом, кармустином, хлорамбуцилом, циклофосфамідом або рицином А. Найкращими токсичними лікарськими молекулами, відповідно до винаходу, є сполуки, які інгібують складання мікротрубочок та які проявляють антипроліферативну і/або цитотоксичну дію.

Найкращим, відповідно до винаходу, є антитіло, кон'юговане з терапевтичною молекулою або засобом, таким як цитотоксин, який впливає на клітини, які знаходяться у стані повільного росту або в стані спокою, такі як ракові стовбурові клітини. Такі терапевтичні молекули включають терапевтичні молекули, які впливають на мРНК і/або синтез білків. Відомі деякі інгібітори транскрипції. Наприклад, актиноміцин D, який є як інгібітором транскрипції, так і агентом, який пошкоджує ДНК, інтеркалізує (вставляється) у ДНК і в такий спосіб інгібує стадію ініціації транскрипції. Флавопіридол "націлений" на стадію елонгації транскрипції. α -аманітин зв'язується безпосередньо із РНК-полімеразою II, що приводить до інгібування обох стадій як ініціації, так і елонгації.

Антитіла також можуть бути кон'юговані з радіоізотопом, наприклад, йодом-131, ітрієм-90 або індієм-111, для одержання цитотоксичних радіофармацевтичних засобів.

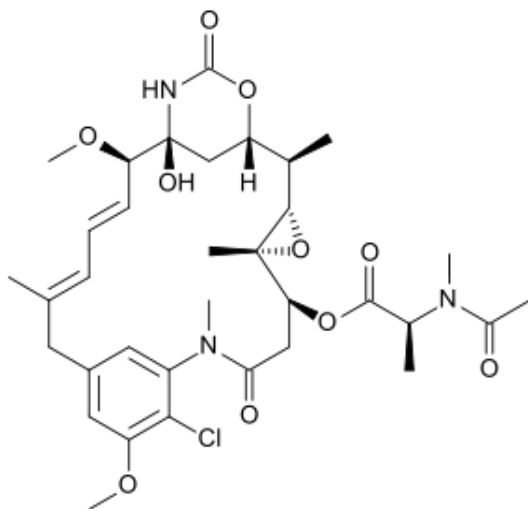
Кон'югати антитіл запропонованих винаходом можна використовувати для того, щоб модифікувати дану біологічну відповідь, при цьому лікарська частка не повинна розглядатися як обмежувальна класичні хімічні терапевтичні лікарські засоби. Наприклад, лікарська частка може бути пептидом, білком або поліпептидом, яка має бажану біологічну активність. Такий білок може включати, наприклад, ферментативно активний токсин, або його активний фрагмент, такий як абрін, рицин А, екзотоксин синьогнійної палички або дифтерійний токсин; білок, такий як фактор некрозу пухлини або інтерферон- γ ; або модифікатори біологічної відповіді такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючий фактор ("GM-CSF"), гранулоцитарний

колонієстимулюючий фактор ("G-CSF") або інші фактори росту. Іншими кращими лікарськими фрагментами (молекулами) Відповідно до винаходу є куркумін, саліноміцин і сульфорафан.

Методи кон'югації такої терапевтичної частки з антитілом є добре відомими, 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).

В одному кращому варіанті здійснення антитіло запропоноване даним винаходом кон'юговане з однією або більше молекулами майтансиноїду.

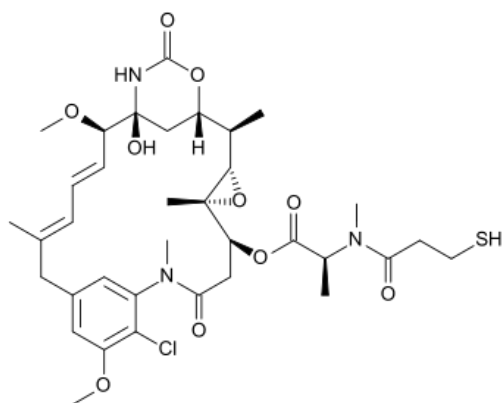
Майтансиноїди є сильнодіючими сполуками, націленими на мікротрубочки, які інгібують проліферацію клітин при мітозі. Майтансиноїди є похідними майтансину, який є 19-членною анса-макролідною структурою, приєднаною до бензольного кільця, яке містить хлор. Майтансин має наступну формулу:



Було виявлено, що деякі мікроби також продукують майтансиноїди, такі як майтансинол і С-3 ефіри майтансинолу (США патент № 4,151,042). Про синтетичний майтансинол й аналогах майтансинолу повідомлялося, наприклад, у патентах США № 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,362,663; і 4,371,533, and Kawai et al (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451, включених в опис шляхом посилання.

Майтансиноїди добре відомі в даній галузі техніки й можуть бути синтезовані за допомогою відомих методів або виділені із природних джерел. Найкращими майтансиноїдами Відповідно до винаходу є тіол-вмісні похідні майтансину, такі як DM1 і DM4. Такі тіол-вмісні похідні майтансину включають сполуки, у яких метильна група, пов'язана з карбонільною групою, заміщається групою, яка містить вільну сульфгідрильну групу, таку як група -R-SH, де R є алкіленовою групою або іншими групами, що містять атоми вуглецю.

DM1, також відомий як мертанзин, є майтансиноїдом, який має наступну формулу:



Зокрема, термін "мертанзин" або "DM1" відноситься до сполуки N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропіл)-майтансин.

"DM4" відноситься до сполуки N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин.

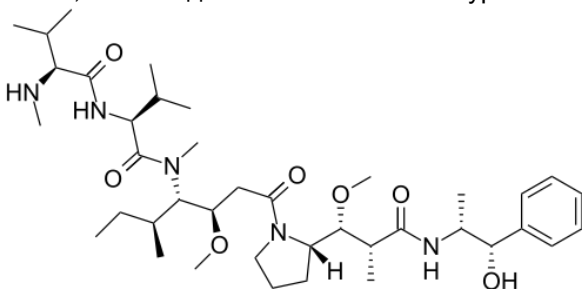
Кон'югати анти-CLDN6 антитіло-майтансиноїд одержують шляхом хімічного зв'язування анти-CLDN6 антитіла з молекулою мایتансиноїда без значного зменшення біологічної активності або антитіла або молекули мایتансиноїду. У середньому 3-4 молекули мایتансиноїду можуть бути кон'юговані розраховуючи на молекулу антитіла, хоча очікується, що навіть одна молекула токсин/антитіло підсилює цитотоксичність у порівнянні з використанням "неозброєного" антитіла.

Щодо цього термін "антитіло, ковалентно з'єднане, щонайменше, з однією молекулою токсичного лікарського засобу" включає ситуації, коли одна або більше молекул одного лікарського засобу ковалентно з'єднується з молекулою антитіла, а також коли різні лікарські засоби ковалентно приєднуються до молекули антитіла. В останній ситуації одна або більше молекул кожного з різних лікарських засобів може бути приєднана до молекули антитіла, або їх комбінація (наприклад, приєднується одна молекула одного лікарського засобу, і поряд з тим приєднуються кілька молекул іншого лікарського засобу).

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами або похідними доластатину, ауристатинами (патенти США № 5 635 483; 5 780 588, включені в опис як посилення). Ауристатини є синтетичними аналогами доластатину 10, продукту природного походження, отриманого з морського молюска, *Dolabella auricularia*. Подібно до мایتансиноїдів ауристатини руйнують мікротрубочки. Молекула доластатину або ауристатину може приєднуватися до антитіла на N (аміно) кінці або C (карбоксильному) кінці пептидної молекули.

Типові варіанти здійснення ауристатину включають молекули монометил ауристатину, такі як MMAE і MMAF, які переважно приєднуються на N-кінці.

MMAE, також відомий як монометил ауристатин E, має наступну формулу:



Зокрема, термін "MMAE" відноситься до сполуки (S)-N-((3R, 4S, 5S)-1-((S)-2-((1R, 2R)-3-(((1S, 2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N, 3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо)бутанаміду. MMAE є фактично дезметил-ауристатином E, тобто N-кінцева аміно-група має тільки один метильний замісник замість двох, як у самому ауристатині E.

Відповідно до винаходу найкращими є кон'югати антитіло-vc ауристатин, такі як кон'югати антитіло-vcMMAE. Відповідно до винаходу, термін "антитіло-всауристатин" або "vcMMAE" відноситься до кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC), що містить ауристатин, такий як MMAE, з'єднаний з антитілом через лізосомально-розщеплювальний дипептид, валін-цитрулін (vc).

MMAF, також відомий як монометил ауристатин F, відноситься до сполуки (S)-2-((2R, 3R)-3-((S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-((S)-N, 3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламіно)бутанамідо) бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропанова кислота.

5 У даній галузі техніки відома велика кількість з'єднувальних груп, придатних для одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб.

В одному варіанті здійснення винаходу антитіло з'єднується з лікарським засобом через біфункціональний зшиваючий агент. Вираз "біфункціональний зшиваючий агент", як він використовується у описі, відноситься до реагенту, який має дві реакційно-здатні групи, одна з яких здатна взаємодіяти з антитілом, тоді як інша група здатна взаємодіяти з лікарським засобом, щоб з'єднати антитіло з лікарським засобом, утворивши тим самим кон'югат. В контексті винаходу може використовуватися будь-який придатний біфункціональний зшиваючий агент, за умови, що лінкерний агент забезпечує збереження властивостей лікарського засобу, наприклад, цитотоксичності та націлювальної здатності антитіла. Бажано, молекула лінкера з'єднує лікарський засіб з антитілом за допомогою хімічних зв'язків, завдяки чому лікарський засіб і антитіло хімічно з'єднуються один з одним (наприклад, ковалентно зв'язуються).

У одному варіанті здійснення біфункціональний зшиваючий агент, містить нерозщеплюваний лінкер. Нерозщеплюваний лінкер є будь-яким хімічним фрагментом, здатним з'єднувати лікарський засіб, такий як майтансиноїд, з антитілом стійким ковалентним зв'язком. Бажано, нерозщеплюваний лінкер є нерозщеплюваним за фізіологічних умов, зокрема, всередині клітини. Таким чином, нерозщеплювані лінкери значною мірою є стійкими до розщеплення, індукованого кислотою, світлом, пептидазою, естеразою і розщепленням дисульфідного зв'язку, за умов, за яких лікарський засіб або антитіло залишається активним. Придатні зшиваючі агенти, які утворюють нерозщеплювані лінкери між лікарським засобом і антитілом, добре відомі в даній галузі техніки. В одному варіанті здійснення лікарський засіб з'єднується з антитілом за допомогою тіоефірного зв'язку. Приклади нерозщеплюваних лінкерів включають лінкери, які мають фрагмент на основі малеїміду або галоацетилу для взаємодії з лікарським засобом, таким як сульфгідрильна група майтансиноїду. Такі біфункціональні зшиваючі агенти, добре відомі в даній галузі техніки й включають, але не обмежуючись названими, N-сукцинімідил 4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC) і N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроат), який є "довголанцюговим" аналогом SMCC (LC-SMCC). Бажано, біфункціональним зшиваючим агентом є SMCC. При використанні такого лінкера, лікарський засіб, такий як мертанзин, може бути приєднаний через 4-(3-меркапто-2,5-диоксо-1-піролідінметил)-циклогексанкарбонову кислоту з аміногрупами, такими як вільні NH₂-групи залишків лізину антитіла. Кожна молекула кон'югата антитіло-лікарський засіб може містити одну молекулу антитіла, з'єднану з декількома молекулами мертанзину.

В одному з кращих варіантів здійснення зшиваючий агент є розщеплюваним лінкером. Бажано, розщеплюваний лінкер є таким, що розщеплюється за фізіологічних умов, зокрема, усередині клітини. Приклади придатних, розщеплюваних лінкерів включають дисульфідні лінкери, кислотолабільні лінкери, фотоллабільні лінкери, лінкери, лабільні до впливу пептидаз і лінкери, лабільні до впливу естераз. Лінкери, які містять дисульфід, є лінкерами, які розщеплюються за допомогою дисульфідного обміну, які можуть існувати за фізіологічних умов. Кислотолабільні лінкери є лінкерами, які розщеплюються за кислого значення pH. Наприклад, деякі внутрішньоклітинні компартменти, такі як ендосоми й лізосоми, мають кисле значення pH (pH 4-5) і забезпечують умови, придатні для розщеплення кислотолабільних лінкерів. Фотоллабільні лінкери використовуються на поверхні тіла й у багатьох порожнинах тіла, доступних для світла. Більше того, інфрачервоне світло проникає крізь тканини. Лінкери, лабільні до впливу пептидаз, можуть використовуватися для розщеплення деяких пептидів усередині або зовні клітин. В одному варіанті здійснення, розщеплювальний лінкер розщеплюється за м'яких умов, тобто умов усередині клітини, за яких активність цитотоксичного засобу не зазнає впливу.

В одному кращому варіанті здійснення лінкер є лінкером, який містить або складається з дипептиду валін (Val) - цитрулін (Cit) (vc), який розщеплюється катепсином усередині пухлинних клітин.

Відповідно до винаходу термін "терапія раку, спрямована проти ракових стовбурових клітин" стосується будь-якої терапії, яка може використовуватися для націлювання та бажано знищення й/або порушення проліферації або життєздатності ракових стовбурових клітин. Така терапія включає i) антитіла, фрагменти антитіл і білки, які є або "неозброєними" або кон'югованими з терапевтичною молекулою, яка націлюється на визначені мішені на клітинній

поверхні ракових стовбурових клітин, наприклад, CLDN6, (наприклад, антитіла або кон'югати антитіл, які мають здатність зв'язуватися з CLDN6, як описано вище) або ii) невеликі молекули, які знижують проліферацію або життєздатність ракової стовбурової клітини. В окремому варіанті здійснення засіб зв'язується з антигеном, який експресується на більш високому рівні на ракових стовбурових клітинах, ніж на нормальних стовбурових клітинах. В окремому варіанті здійснення засіб специфічно зв'язується з антигеном ракової стовбурової клітини.

Термін "зв'язування", відповідно до винаходу, переважно стосується специфічного зв'язування.

Згідно із даним винаходом, антитіло є здатним зв'язуватися із заздалегідь визначеною мішенню, якщо воно має значну спорідненість до зазначеної визначеної мішені й зв'язується із зазначеною визначеною мішенню в стандартних методах дослідження. "Спорідненість" або "спорідненість зв'язування" часто оцінюється рівноважною константою дисоціації (K_d). Переважно термін "значна спорідненість" відноситься до зв'язування з визначеною мішенню з константою дисоціації (K_d) 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.

Антитіло не здатне (значно) зв'язуватися з мішенню, якщо воно не має значну спорідненість до зазначеної мішені й не зв'язується значною мірою, зокрема, не зв'язується на рівні, який піддається визначенню, із зазначеною мішенню в стандартних методах. Бажано, антитіло зв'язується із зазначеною мішенню на рівні, який не піддається визначенню, якщо воно присутнє у концентрації до 2, бажано 10, ще краще 20, зокрема, 50 або 100 мкг/мл або вище. Бажано антитіло не має значної спорідненості до мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_d , яка є, щонайменше, в 10-раз, 100-раз, 10^3 -раз, 10^4 -раз, 10^5 -раз або 10^6 -раз вище, ніж K_d зв'язування з визначеною мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло. Наприклад, якщо K_d зв'язування антитіла з мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло, становить 10^{-7} М, тоді K_d зв'язування з мішенню, до якої антитіло не має значної спорідненості, становила б, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Антитіло є специфічним для визначеної мішені, якщо воно здатне зв'язуватися із зазначеною визначеною мішенню, при цьому воно не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, тобто має незначну спорідненість до інших мішеней і не зв'язується значно з іншими мішенями при стандартних методах аналізу. Відповідно до винаходу, антитіло є специфічним до CLDN6, якщо воно здатне зв'язуватися з CLDN6, але практично не здатне зв'язуватися з іншими мішенями. Бажано, антитіло є специфічним до CLDN6, якщо афінність до або зв'язування з іншими мішенями не перевищує значно афінності до або зв'язування з білками, неспорідненими з CLDN6, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, людський сироватковий альбумін (HSA) або трансмембранні білки, які не є клаудинами, такими як молекули MHC або рецептор трансферину або будь-який інший специфічний поліпептид. Бажано, антитіло є специфічним для певної мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_d , яка, щонайменше, в 10 разів, 100 разів, 10^3 разів, 10^4 разів, 10^5 разів або 10^6 разів нижча, ніж K_d зв'язування з мішенню, що не є специфічною. Наприклад, якщо K_d зв'язування антитіла з специфічною мішенню становить 10^{-7} М, тоді K_d зв'язування з не специфічною мішенню, має бути, 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 можна визначити експериментально, використовуючи будь-який придатний метод, дивися, наприклад, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Jam's Immunology, W. H. Freeman i Company New York, N Y (1992), і описані тут методи. Спорідненість можна легко визначити за допомогою звичайних методів, таких як рівноважний діаліз; за допомогою приладу Biorog 2000, використовуючи загальні методики, запропоновані виробником; за допомогою радіоімунологічного аналізу з використанням міченого радіоактивним ізотопом цільового антигену або іншими методами, відомими фахівцям. Дані щодо спорідненості можна проаналізувати, наприклад, за допомогою методу Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Визначена спорідненість окремої взаємодії антитіло-антиген може варіювати, якщо вимірювання проводився за різних умов, наприклад, концентрації солі, pH. Таким чином, вимірювання спорідненості й інших параметрів зв'язування антигену, наприклад, K_d , IC_{50} , переважно проводяться за допомогою стандартизованих розчинів антитіла й антигену й стандартизованого буфера.

При використанні в описі "ізотип" відноситься до класу антитіл (наприклад, IgM або IgG 1), які кодуються генами константної області важкого ланцюга.

Вираз "перемикання ізотипа", як він використовується в описі, відноситься до явища, за допомогою якого клас або ізотип антитіла змінюється від одного класу Ig до одного з інших класів Ig.

Термін "природний", як він використовується в описі стосовно об'єкта, відноситься до тієї обставини, що об'єкт може бути знайдений у природі. Наприклад, послідовність поліпептиду або полінуклеотиду, присутня в організмі (включаючи віруси), яка може бути виділена із природного джерела, і яка не була навмисно модифікована людиною в лабораторії, є природною.

Термін "перегрупувана", як він використовується в описі, відноситься до конфігурації важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобулінового локусу, у якому V сегмент розташовується безпосередньо поруч із D-J або J сегментом у конформації, що кодує фактично повний VH або VL домен, відповідно. Перегрупуваний генний локус імуноглобуліну (антитіла) може бути встановлений шляхом порівняння із зародковою ДНК; перегрупуваний локус буде мати, щонайменше, один рекомбінований семичленний/дев'ятичленний гомологічний елемент.

Термін "перегрупувана" або "зародкова конфігурація", як він використовується в описі у відношенні V сегмента, відноситься до конфігурації, при якій V сегмент є нерекomboнованим для того, щоб бути безпосередньо поруч із D або J сегментом.

Бажано, зв'язування антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, із клітинами, які експресують CLDN6, викликає або опосередковує знищення клітин, які експресують CLDN6. Клітини, які експресують CLDN6, бажано є раковими стовбуровими клітинами й, зокрема, є клітинами ракових захворювань, описаних у даному документі, такими як ракові стовбурові клітини раку яєчника. Бажано, антитіло викликає або опосередковує знищення клітин, індуючи що-небудь одне або кілька з поміж опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC) лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC) лізису, апоптозу й інгібування проліферації клітин, які експресують CLDN6. Бажано, ADCC-опосередкований лізис відбувається в присутності ефекторних клітин, які в окремих варіантах здійснення вибирають із групи, яка складається з моноцитів, мононуклеарних клітин, NK-клітин і PMNs. Інгібування проліферації клітин можна виміряти *in vitro* шляхом визначення проліферації клітин методом аналізу із застосуванням бромдезоксидіурдину (5-бром-2-дезоксидіурдин, BrdU). BrdU є синтетичним нуклеозидом, аналогом тимідину, і може вбудовуватися в новосинтезовану ДНК клітин, що відтворюються шляхом клітинного поділу (під час S фази клітинного циклу), замінюючи тимідин під час реплікації ДНК. Виявлення "включеної" хімічної речовини за допомогою, наприклад, антитіл, специфічних до BrdU, указує на клітини, які активно відтворювали свою ДНК.

У кращих варіантах здійснення антитіла, описані в даному документі, можуть бути охарактеризовані однією або кількома з поміж наступних властивостей:

a) специфічність до CLDN6;

b) афінність зв'язування з CLDN6 близько 100 нМ або менш, бажано, близько 5^{-10} нМ або менше і ще краще близько 1^{-10} нМ або менше,

c) здатність викликати або опосередковувати CDC CLDN6-позитивних клітин;

d) здатність викликати або опосередковувати ADCC CLDN6-позитивних клітин;

e) здатність інгібувати ріст CLDN6-позитивних клітин;

f) здатність викликати апоптоз CLDN6-позитивних клітин.

В одному варіанті здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, має здатність зв'язуватися з епітопом, присутнім в CLDN6, бажано епітопом, розташованим у межах позаклітинних доменів CLDN6, зокрема, у першій позаклітинній петлі, бажано в положенні амінокислот від 28 до 76 CLDN6, або в другій позаклітинній петлі, бажано в положенні амінокислот від 141 до 159 CLDN6. В окремих варіантах здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, якого немає на CLDN9. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, якого немає на CLDN4 і/або CLDN3. Найбільш бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з епітопом на CLDN6, якого немає на білку CLDN, відмінному від CLDN6.

Антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, бажано зв'язується з CLDN6, але не з CLDN9, і переважно не зв'язується з CLDN4 і/або CLDN3. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, є специфічним до CLDN6. Бажано, антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з CLDN6, експресованим на клітинній поверхні. В окремих кращих варіантах здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, зв'язується з нативними епітопами CLDN6, присутнього на клітинній поверхні живих клітин.

У кращому варіанті здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка містить амінокислотну послідовність, обрану із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9 і її фрагмента.

У кращому варіанті здійснення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), яка містить амінокислотну послідовність обрану із групи, яка складається з SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 11, 12 та їх фрагмента.

У деяких кращих варіантах здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, містить комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL), обрану з наступних можливих варіантів (i) - (vii):

- (i) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 3, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент,
- (ii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент,
- (iii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8, або її фрагмент,
- (iv) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 9, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 10, або її фрагмент,
- (v) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент,
- (vi) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 11, або її фрагмент,
- (vii) VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 12, або її фрагмент.

В найкращому варіанті здійснення антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, містить наступну комбінацію варіабельної області важкого ланцюга (VH) і варіабельної області легкого ланцюга (VL):

VH містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 5, або її фрагмент, і VL містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO: 4, або її фрагмент.

Термін "фрагмент" стосується, зокрема, однієї або кількох з поміж гіперваріабельних ділянок (CDRs), бажано, щонайменше, CDR3 варіабельної ділянки, варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL). В одному варіанті здійснення зазначену одну або кілька з поміж гіперваріабельних ділянок (CDRs) вибирають із набору гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3. В найкращому варіанті здійснення термін "фрагмент" відноситься до гіперваріабельних ділянок CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH) і/або варіабельної області легкого ланцюга (VL).

В одному варіанті здійснення антитіло, яке містить одну або кілька CDRs, набір CDRs або комбінацію наборів CDRs, як описано тут, включає зазначені CDRs разом з їхніми проміжними каркасними ділянками. Бажано, дана ділянка буде також включати, щонайменше, близько 50 % будь-якої або обох з поміж першої й четвертої каркасних ділянок, 50 % є С-кінцевими 50 % першої каркасної ділянки й N-кінцевими 50 % четвертої каркасної ділянки. Створення антитіл методами рекомбінантних ДНК може призводити до введення N- або С-кінцевих залишків у варіабельні ділянки, кодовані лінкерами, уведеними для полегшення клонування або інших стадій маніпуляції, включаючи введення лінкерів для з'єднання варіабельних областей винаходу з додатковими білковими послідовностями, які містять важкі ланцюги імуноглобулінів, інші варіабельні домени (наприклад, при одержанні діабодів) або білкові мітки.

В одному варіанті здійснення антитіло, яке містить один або кілька CDRs, набір CDRs або комбінацію наборів CDRs, як описано тут, містить зазначені CDRs у каркасній ділянці антитіла людини.

Посилання в даному документі на антитіло, яке містить у своєму важкому ланцюзі конкретний ланцюг або конкретну область (ділянку) або послідовність, переважно відноситься до ситуації, у якій усі важкі ланцюги зазначеного антитіла містять зазначений конкретний ланцюг, область або послідовність. Це відповідно може бути застосованим до легкого ланцюга антитіла.

Повинно бути зрозумілим, що описані в документі антитіла можуть доставлятися пацієнтові шляхом введення нуклеїнової кислоти, наприклад, РНК, що кодує антитіло, і/або шляхом введення клітини-хазяїна, яка містить нуклеїнову кислоту, наприклад, РНК, що кодує антитіло. Із цього випливає, що нуклеїнова кислота, що кодує антитіло, при введенні пацієнтові може перебувати в "голій" формі або в відповідній системі доставки, наприклад, у формі ліпосом або вірусних часток, або усередині клітини-хазяїна. Введена нуклеїнова кислота може продукувати антитіло протягом тривалих періодів часу, таким чином, зменшуючи нестабільність, яка, щонайменше, частково, спостерігається для терапевтичних антитіл. Нуклеїнові кислоти, призначені для доставки пацієнтові, можуть продукуватися рекомбінантними способами. Якщо нуклеїнова кислота вводиться пацієнтові, не перебуваючи при цьому усередині клітини-хазяїна, переважно вона захоплюється клітинами пацієнта для експресії антитіла, яке кодується даною нуклеїновою кислотою. Якщо нуклеїнова кислота вводиться пацієнтові, перебуваючи всередині клітини-хазяїна, вона переважно експресується клітиною-хазяїном "усередині пацієнта", для

того щоб продукувати антитіло, яке кодується даною нуклеїною кислотою.

Термін "нуклеїнова кислота", як він використовується в описі, включає ДНК і РНК, таку як геномна ДНК, кДНК, мРНК, отримані рекомбінантним шляхом або синтезовані хімічним шляхом молекули. Нуклеїнова кислота може бути одноланцюговою або дволанцюговою. РНК включає *in vitro* транскрибовану РНК (IVT RNA) або синтетичну РНК.

Нуклеїнові кислоти можуть бути поміщені у вектор. Термін "вектор", як він використовується в описі, включає будь-які вектори, відомі фахівцям, включаючи плазмідні вектори, космідні вектори, фагові вектори, наприклад, фага лямбда, вірусні вектори, наприклад, аденовірусні або бакуловірусні вектори, або штучні хромосомні вектори, такі як бактеріальні штучні хромосоми (BAC), штучні хромосоми дріжджів (YAC) або P1 штучні хромосоми (PAC). Зазначені вектори включають експресійний, а також клонуєчий вектори. Експресійні вектори включають плазміди, а також вірусні вектори й звичайно містять бажану, кодуєчу послідовність і відповідні послідовності ДНК, необхідні для експресії функціонально зв'язаної, кодуєчої послідовності в конкретному організмі-хазяїні (наприклад, бактерії, дріжджах, рослині, комасі або ссавцеві) або в системах експресії *in vitro*. Клонуючі вектори, як правило, використовуються для створення й ампліфікації деяких бажаних фрагментів ДНК і можуть не містити функціональні послідовності, необхідні для експресії бажаних фрагментів ДНК.

У контексті даного винаходу термін "РНК" стосується молекули, яка містить залишки рибонуклеотидів, і яка бажано, повністю або в основному, складається із залишків рибонуклеотидів. "Рибонуклеотиди" мають відношення до нуклеотиду з гідроксильною групою в 2'-положенні β-D-рибофуранозильної групи. Термін включає дволанцюгову РНК, одноланцюгову РНК, ізолювану РНК, таку як частково очищена РНК, практично чисту РНК, синтетичну РНК, отриману рекомбінантним способом РНК, а також модифіковану РНК, яка відрізняється від природної РНК вставкою, делецією, заміною й/або зміною одного або кількох нуклеотидів. Такі зміни можуть включати додавання нуклеотидного матеріалу, наприклад, до кінця(ів) РНК або усередину, наприклад, одного або кількох нуклеотидів РНК. Нуклеотиди в молекулах РНК також можуть містити нестандартні нуклеотиди, такі як нуклеотиди неприродного походження або хімічно синтезовані нуклеотиди або дезоксинуклеотиди. Ці змінені РНК можуть називатися аналогами або аналогами РНК природного походження.

Згідно із даним винаходом термін "РНК" включає й бажано має відношення до "мРНК", що означає "матричну РНК", а також відноситься до "транскрипту", який може продукуватися з використанням ДНК, як матриці й кодує пептид або білок. У більшості випадків мРНК містить 5' нетрансльовану область (5'-UTR), область, яка кодує білок або пептид, і 3' нетрансльовану область (3'-UTR). мРНК має обмежений час напівжиття в клітинах і *in vitro*. Переважно, мРНК продукується шляхом транскрипції *in vitro* з використанням ДНК-матриці. В одному варіанті здійснення винаходу РНК одержують шляхом транскрипції *in vitro* або хімічного синтезу. Метод транскрипції *in vitro* відомий фахівцям. Наприклад, існує цілий ряд комерційно доступних наборів для *in vitro* транскрипції.

В одному варіанті здійснення даного винаходу РНК є самореplikованою РНК, такою як одноланцюгова самореplikована РНК. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК є одноланцюговою позитивно-полярною РНК. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК є вірусною РНК або РНК, отриманою з вірусної РНК. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК є геномною РНК альфа-вірусу або походить із геномною РНК альфа-вірусу. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК є експресувальним вектором вірусного гена. В одному варіанті здійснення вірус є вірусом лісу Семлікі. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК містить один або кілька трансгенів, щонайменше, один із зазначених трансгенів кодує описане в документі антитіло. В одному варіанті здійснення в тому випадку, якщо РНК є вірусною РНК або походить із вірусної РНК, трансгени можуть частково або повністю заміщати вірусні послідовності, такі як вірусні послідовності, що кодуєть структурні білки. В одному варіанті здійснення самореplikована РНК є *in vitro* транскрибованою РНК.

Геном альфавірусів є одноланцюговою позитивно-полярною РНК (ssRNA(+)), яка кодує дві відкриті рамки зчитування (ORF) для великих поліпротеїнів. ORF на 5'-кінці генома кодує неструктурні протеїни nSP1-nSP4 (nSP1-4), які транскрибуються й процесуються з використанням РНК-залежної РНК-полімерази (реплікази); ORF на 3'-кінці кодує структурні білки – капсид і глікопротеїни. Обидві ORF розділяються так званим субгеномним промотором (SGP), який керує транскрипцією структурної ORF. При використанні структурних протеїнів як генетичних векторів, вони за SGP звичайно заміняються трансгенами. Для того, щоб упакувати такі вектори у вірусні частки, структурні протеїни в більшості випадків експресуються *in trans* з допоміжних конструкцій. Альфа-віруси реплікуються в цитоплазмі інфікованих клітин винятково на РНК рівні. Після інфікування ssRNA(+) геном діє як мРНК для трансляції nsp1234 попередника полібілка,

який на ранніх стадіях життєвого циклу вірусу автопротеолітично процесується до фрагментів nsр123 і nsр4. Фрагменти nsр123 і nsр4 утворюють (-)ланцюговий репліказний комплекс, який транскрибує (-)ланцюгову РНК із геномної матриці РНК. На більш пізніх стадіях nsр1234 поліпротеїн повністю розщеплюється до окремих білків, які збираються в (+)ланцюговий репліказний комплекс, який синтезує нові (+)ланцюгові геноми, а також субгеномні транскрипти, які кодують структурні білки або трансгени. Субгеномна РНК, а також нова геномна РНК, кепірується й поліаденілюється й у такий спосіб розпізнається, як мРНК, після інфікування клітин-мішеней. Тільки нова геномна РНК містить сигнал упакування, який забезпечує особливе упакування геномної РНК у бадинг-віріони. Привабливість альфа-вірусних репліконів для векторології ґрунтується на позитивній орієнтації "кепіруваного" і поліаденільованого РНК генома. Трансльований реплікон РНК може бути легко синтезований *in vitro*, при цьому "кепірування" можна одержати шляхом додавання кеп-аналога *in vitro* в реакцію транскрипції, а полі-А хвості можуть кодуватися як полі-Т треки на плазмідних матрицях. Транскрибовані (IVT) *in vitro* реплікони трансфікують за допомогою загальновідомих методів трансфекції, причому навіть низькі кількості вихідної IVT РНК збільшуються швидко. У межах декількох годин після переносу трансгени, що розташовуються "нижче" SGP, транскрибуються до дуже великої кількості копій приблизно від 40,000 до 200,000 копій субгеномної РНК на клітину, тому не дивно, що рекомбінантні білки сильно експресуються. Залежно від певної мети, IVT реплікони можуть трансфікуватися безпосередньо в клітини-мішені або впаковуватися в альфа-вірусні частки за допомогою допоміжних векторів, які забезпечують структурні гени *in trans*. Перенос у шкіру або м'язи приводить до високої й тривалої місцевої експресії, паралельної із сильною індукцією гуморальної й клітинної імунної відповіді.

З метою збільшення експресії й/або стабільності РНК, яка використовується згідно із даним винаходом, вона може бути модифікована, переважно без зміни послідовності експресованого пептиду або білка.

Термін "модифікація" як він використовується у даному винаході щодо РНК, включає будь-яку модифікацію РНК, яка не існує в природних умовах у зазначеній РНК.

В одному варіанті здійснення винаходу РНК, яка використовується згідно із даним винаходом, не має "непокритих" (некіпованих) 5'-трифосфатів. Видалення таких "непокритих" 5'-трифосфатів може бути досягнуте шляхом обробки РНК фосфатазою.

Відповідно до винаходу РНК може містити модифіковані природні або синтетичні рибонуклеотиди для збільшення її стабільності й/або зменшення цитотоксичності. Наприклад, в одному варіанті здійснення в РНК, яка використовується згідно із даним винаходом, 5-метилцитидин заміняється частково або повністю, бажано повністю, на цитидин. Альтернативно або додатково, в одному варіанті здійснення в РНК, яка використовується згідно із даним винаходом, псевдоуридин заміняється частково або повністю, бажано повністю, на уридин.

В одному варіанті здійснення термін "модифікація" стосується забезпечення РНК 5'-кепом або аналогом 5'-кепа. Термін "5'-кеп" відноситься до кеп-структури, виявленої на 5'-кінці молекули мРНК, яка звичайно складається з гуанозинового нуклеотида, з'єданого із мРНК за допомогою незвичайного 5' - 5' трифосфатного зв'язку. В одному варіанті здійснення цей гуанозин є метильованим в 7-положенні. Термін "звичайний 5'-кеп" відноситься до природного 5'-кепу РНК, бажано до 7-метилгуанозинового кепу (m7G). У контексті даного винаходу термін "5'-кеп" включає аналог 5'-кепа, який походить на структуру РНК кепу й зазнає модифікації з метою додання здатності стабілізувати РНК, у випадку приєднання до неї, переважно *in vivo* й/або в клітині.

Забезпечення РНК 5'-кепом або аналогом 5'-кепа може бути досягнуте шляхом *in vitro* транскрипції матриці ДНК у присутності зазначеного 5'-кепа або аналога 5'-кепа, при цьому зазначений 5'-кеп котранскрипційно вбудовується в утворений ланцюг РНК, або РНК може бути отримана, наприклад, за допомогою *in vitro* транскрипції, і 5'-кеп може бути прикріплений до РНК посттранскрипційно з використанням кепіруючих ферментів, наприклад, кепіруючих ферментів вірусу коров'ячої віспи.

РНК може містити додаткові модифікації. Наприклад, додатковою модифікацією РНК, яка використовується в даному винаході, може бути подовження або скорочення хвоста природного полі(А) або зміна 5'- або 3'-нетрансльованих областей (UTR), наприклад, уведення такої UTR, яка не пов'язана з кодуючою областю зазначеної РНК, наприклад, вставка однієї або кількох, бажано двох копій 3'-UTR, отриманих з гена глобіну, такого як альфа 2-глобін, альфа 1-глобін, бета-глобін, бажано бета-глобіну, ще краще людського бета-глобіну.

Отже, для збільшення стабільності й/або експресії РНК, яка використовується згідно із даним винаходом, вона може бути модифікована для того, щоб бути присутньою у комбінації з полі-А послідовністю, яка переважно має довжину від 10 до 500, ще краще від 30 до 300, навіть

ще краще від 65 до 200 і, зокрема, від 100 до 150 залишків аденозину. В найкращому варіанті здійснення полі-А послідовність має в довжину приблизно 120 залишків аденозину. На додачу до цього, включення двох або кількох 3'-нетрансльованих областей (UTR) в 3'- нетрансльовану область молекули РНК може давати в результаті збільшення ефективності трансляції. В одному

5 окремому варіанті здійснення 3'-UTR походить із гена β-глобіну людини.

Бажано, РНК, якщо вона доставлена, тобто трансфікована в клітину, зокрема, клітину присутню *in vivo*, експресує закодований білок або пептид.

Термін "трансфекція" стосується введення нуклеїнових кислот, зокрема, РНК, у клітину. Для цілей даного винаходу термін "трансфекція" також включає введення нуклеїнової кислоти в клітину або поглинання нуклеїнової кислоти такою клітиною, при цьому дана клітина може бути присутньою у суб'єкта, наприклад, пацієнта. Таким чином, згідно із даним винаходом, клітина для трансфекції нуклеїнової кислоти, описаної в даному документі, може бути присутньою *in vitro* або *in vivo*, наприклад, клітина може утворювати частину органа, тканини й/або організму пацієнта. Відповідно до винаходу, трансфекція може бути тимчасовою або постійною. У

15 відношенні деяких випадків застосування трансфекції, досить, якщо трансфікований генетичний матеріал експресується тільки тимчасово. Оскільки нуклеїнова кислота, уведена в процесі трансфекції, звичайно не інтегрується в ядерний геном, привнесена (чужорідна) нуклеїнова кислота буде "розведена" у результаті мітозу або деградована. Клітини, що допускають епісомальну ампліфікацію нуклеїнових кислот, значно зменшують "ступінь розведення". Якщо є бажаним щоб трансфікована нуклеїнова кислота дійсно залишалася в геномі клітини та її дочірніх клітин, повинна проводитися стабільна трансфекція. РНК може бути трансфікована в клітини, щоб тимчасово експресувати кодований білок.

20

Термін "стабільність" РНК має відношення до "часу напівжиття" РНК. "Час напівжиття" стосується періоду часу, який необхідний, щоб усунути половину активності, кількості або числа молекул. У даному контексті даного винаходу час напівжиття РНК показує стабільність зазначеної РНК. Час напівжиття РНК може впливати на "тривалість експресії" РНК. Можна припускати, що РНК, яка має тривалий час напівжиття, буде експресуватися протягом тривалого періоду часу.

25

У контексті даного винаходу термін "трансляція" стосується процесу, при якому генетичний код у ДНК-послідовності транскрибується в РНК. Надалі РНК може транслюватися в білок. Згідно із даним винаходом термін "транскрипція" включає "*in vitro* транскрипцію", при цьому термін "*in vitro* транскрипція" стосується процесу, при якому РНК, зокрема, мРНК, синтезується *in vitro* у безклітинній системі, бажано з використанням придатних клітинних екстрактів. Бажано, для одержання транскриптів використовуються клонуючі вектори. Ці клонуючі вектори в основному визначаються як транскрипційні вектори й згідно із даним винаходом охоплюються терміном "вектор".

30

Термін "трансляція", відповідно до винаходу стосується процесу, який відбувається в рибосомах клітини, за допомогою якого ланцюг матричної РНК керує складанням послідовності амінокислот, щоб одержати пептид або білок.

35

Термін "експресія", як він використовується у даному винаході, у його найбільш загальному значенні, включає вироблення РНК і/або пептидів або білків, наприклад, шляхом транскрипції й/або трансляції. У відношенні РНК термін "експресія" або "трансляція" стосується, зокрема, продукування пептидів або білків. Термін також включає часткову (неповну) експресію нуклеїнових кислот. Більше того, експресія може бути тимчасовою або постійною. Відповідно до

40

винаходу, термін експресія також включає "аберантну експресію" або "аномальну експресію". "Аберантна експресія" або "аномальна експресія", відповідно до винаходу означає, що експресія є зміненою, бажано підвищеною, у порівнянні з контролем, наприклад, станом у суб'єкта, який не має хвороби, пов'язаної з аберантною або аномальною експресією певного білка, наприклад, пухлинного антигену. Підвищення експресії відноситься до підвищення, щонайменше, на 10 %, зокрема, щонайменше, на 20 %, щонайменше, на 50 % або, щонайменше, на 100 % або більше. В одному варіанті здійснення експресія виявляється тільки в ураженій тканині, у той час як експресія в здоровій тканині пригнічена.

45

Термін "специфічно експресується" означає, що білок експресується бажано в конкретній тканині або органі. Наприклад, вираз "пухлинний антиген специфічно експресується в плаценті" означає, що зазначений білок переважно експресується в плаценті й не експресується в інших тканинах або не експресується значною мірою в інших типах тканин або інших органах. Таким чином, білок, який експресується винятково в клітинах плаценти й значною меншою мірою в будь-якій іншій тканині, є специфічно експресованим у клітинах плаценти. У деяких варіантах здійснення пухлинний антиген також може специфічно експресуватися за нормальних умов

50

60 більш ніж у тканині одного типу або в одному органі, наприклад, в 2 або 3 типах тканин або

органах, але бажано не більше, ніж в 3 різних типах тканин або в 3 органах. У цьому випадку пухлинний антиген специфічно експресується в цих органах.

Відповідно до винаходу, термін "РНК кодування" означає, що РНК, якщо вона присутня в відповідному навколишньому середовищі, бажано усередині клітини, може експресуватися, щоб

5 продукувати білок або пептид, який вона кодує.
Деякі аспекти винаходу ґрунтуються на адаптивному переносі клітин-хазяїв, трансфікованих *in vitro* нуклеїновою кислотою, наприклад, РНК, що кодує описане в документі антитіло, і перенесених реципієнтам, наприклад, пацієнтам, бажано після *ex vivo* розмноження від низького рівня випадків фіксації попередників до клінічно значимої кількості клітин. Клітини-хазяї, які використовуються для лікування згідно з даним винаходом, можуть бути аутологічними, алогенними або сингенними відносно реципієнта, який зазнає лікування.

10 Термін "аутологічний" використовується для опису всього, що відбувається в межах того самого суб'єкта. Наприклад, "аутологічний трансплантат" відноситься до трансплантації тканин або органів, джерелом походження яких є той же самий суб'єкт. Такі методи є кращими, оскільки вони дозволяють подолати імунологічний бар'єр, який в іншому випадку приводить до відторгнення.

Термін "алогенний" використовується для опису всього, що походить від різних індивідумів того самого виду. Два або кілька індивідумів називаються алогенними один щодо одного, якщо гени в одному або кількох локусах не є ідентичними.

20 Термін "сингенний" використовується для опису всього, що походить від індивідумів або отримано з тканин, які мають ідентичні генотипи, тобто однойцевих близнюків або тварин того ж самого інбредного штаму або їх тканин.

Термін "гетерологічний" використовується для опису чого-небудь, що складається з багатьох різних елементів. Як приклад, трансплантація кісткового мозку одного індивідуума іншому індивідуумові є гетерологічною трансплантацією. Гетерологічний ген – це ген, отриманий із джерела, відмінного від даного суб'єкта.

25 Термін "пептид" Відповідно до винаходу включає оліго- і поліпептиди й відноситься до речовин, які містять дві або більше, бажано 3 або більше, бажано 4 або більше, бажано 6 або більше, бажано 8 або більше, бажано 9 або більше, бажано 10 або більше, бажано 13 або більше, бажано 16 або більше, бажано 21 або ще краще до 8, 10, 20, 30, 40 або 50, зокрема, до 100 амінокислот, ковалентно з'єднаних пептидними зв'язками. Термін "білок" відноситься до великих пептидів, переважно до пептидів, які містять більше 100 амінокислотних залишків, однак, загалом, терміни "пептиди" і "білки" є синонімами й використовуються як взаємозамінні.

30 Слід урахувати, що викладена в документі ідея щодо специфічних амінокислотних послідовностей, наприклад, зазначених у списку послідовностей, також має відношення до варіантів зазначених специфічних послідовностей, що приводять до утворення послідовностей, які є функціонально еквівалентними до зазначених специфічних послідовностей, наприклад, амінокислотних послідовностей, які демонструють властивості, ідентичні або подібні до властивостей специфічних амінокислотних послідовностей. Однією важливою властивістю є збереження зв'язування антитіла з його мішенню або підтвердження ефекторних функцій антитіла. Бажано, послідовність, яка є варіантом щодо специфічної послідовності, у тому випадку, коли вона заміняє специфічну послідовність в антитілі, зберігає здатність зв'язування зазначеного антитіла з CLDN6 і бажано функції зазначеного антитіла, як описано тут, наприклад, CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис.

35 Наприклад, послідовності, представлені в списку послідовностей, можуть бути модифіковані для того, щоб вилучити один або кілька, бажано всі вільні залишки цистеїну, зокрема, шляхом заміщення залишків цистеїну амінокислотами, відмінними від цистеїну, бажано серином, аланіном, треоніном, гліцином, тирозином, гліцином, тирозином, лейцином або метіоніном, найкраще аланіном або серином.

40 Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що послідовності CDR, гіперваріабельних і варіабельних областей можуть бути модифіковані без втрати здатності зв'язуватися з CLDN6. Наприклад, CDR ділянки будуть або ідентичними або високо гомологічними до ділянок антитіла, визначеного в описі. Під "високогомологічним" мають на увазі, можливість зробити від 1 до 5, бажано від 1 до 4, наприклад від 1 до 3 замін, або 1 або 2 заміни в CDRs. Крім того, гіперваріабельні й варіабельні області можуть бути модифіковані так, щоб вони демонстрували значну гомологію до областей антитіла, зокрема, розкритого в описі.

45 Для цілей даного винаходу "варіанти" амінокислотної послідовності включають варіанти із вставками амінокислот, варіанти з добавками амінокислот, варіанти з делеціями амінокислот і/або варіанти із замінами амінокислот. Варіанти з делеціями амінокислот, які містять делецію на N-кінці й/або C-кінці білка, також називаються N-кінцевими й/або C-кінцевими укороченими

варіантами.

Варіанти із вставкою амінокислот включають вставки однієї або двох або кількох амінокислот в окрему амінокислотну послідовність. У випадку варіантів амінокислотної послідовності, які мають вставку в окрему ділянку амінокислотної послідовності, вставляється

5

один або кілька амінокислотних залишків, хоча при відповідному скринінгу отриманого продукту також можна виявити випадкові вставки.

Варіанти амінокислотних добавок включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття з однією або кількома амінокислотами, наприклад, з 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислотами.

10

Варіанти з делецією амінокислот характеризуються видаленням однієї або кількох амінокислот з послідовності, наприклад, видаленням 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот. Делеції можуть відбуватися в будь-якому місці білка.

Варіанти із замінами амінокислот характеризуються, щонайменше, видаленням одного залишку в послідовності й вставкою на його місце іншого залишку. Перевага віддається модифікаціям, що перебувають у положеннях амінокислотної послідовності, які не є консервативними між гомологічними білками або пептидами, і/або замінам амінокислот на інші амінокислоти, що мають подібні властивості. Бажано амінокислотні зміни в білкових варіантах є консервативними амінокислотними змінами, тобто замінами аналогічно заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативна зміна амінокислоти стосується заміни однієї амінокислоти із родини амінокислот, які є спорідненими за структурою бічного ланцюга.

15

20

Природні амінокислоти підрозділяються на чотири родини: кислі (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан) і незаряджені полярні (гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин) амінокислоти. Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються разом як ароматичні амінокислоти.

Бажано ступінь подібності, краще, ідентичності між даною амінокислотною послідовністю й амінокислотною послідовністю, яка є варіантом зазначеної даної амінокислотної послідовності, буде становити, щонайменше, близько 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, або 99 %. Ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться для амінокислотної області, яка становить, щонайменше, близько 10 %, щонайменше, близько 20 %, щонайменше, близько 30 %, щонайменше, близько 40 %, щонайменше, близько 50 %, щонайменше, близько 60 %, щонайменше, близько 70 %, щонайменше, близько 80 %, щонайменше, близько 90 % або близько 100 % повної довжини еталонної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо еталонна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться, щонайменше, приблизно для 20, щонайменше, приблизно 40, щонайменше, приблизно 60, щонайменше, приблизно 80, щонайменше, приблизно 100, щонайменше, приблизно 120, щонайменше, приблизно 140, щонайменше, приблизно 160, щонайменше, приблизно 180 або приблизно для 200 амінокислот, бажано послідовних амінокислот. У кращих варіантах здійснення приводиться ступінь подібності або ідентичності до повної довжини еталонної амінокислотної послідовності. Вирівнювання для визначення ступеня подібності послідовності, бажано ідентичності послідовності, можна виконати відомими в даній галузі техніки способами, бажано з використанням найкращого способу вирівнювання послідовності, наприклад, Align з використанням стандартних налаштувань, бажано EMBOSS:Ігла, Матриця: Blosum62, відкриття гепи 10,0, продовження гепи 0,5.

25

30

35

40

45

"Подібність послідовності" відображає відсоток амінокислот, які або є ідентичними або є консервативними амінокислотними замінами. "Ідентичність послідовності" між двома амінокислотними послідовностями вказує на відсоток амінокислот, які є ідентичними між даними послідовностями.

Термін "відсоток ідентичності" повинен означати відсоток амінокислотних залишків, ідентичних між двома порівнюваними послідовностями після виконання найбільш оптимального вирівнювання, цей відсоток є чисто статистичним, а відмінності між двома послідовностями розподіляються випадково й у межах їх повної довжини. Порівняння послідовностей між двома амінокислотними послідовностями звичайно здійснюється шляхом порівняння цих послідовностей після їхнього оптимального вирівнювання, зазначене порівняння проводиться за допомогою сегмента або "вікна порівняння" для того, щоб установити й порівняти локальні області подібності послідовності. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути проведене, крім способу "вручну", за допомогою алгоритму локальної гомології Smith і Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, за допомогою алгоритму локальної гомології Neddleman і Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, за допомогою методу пошуку подібності Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, або за допомогою комп'ютерних програм із

50

55

60

застосуванням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N і TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Відсоток ідентичності вираховується шляхом визначення числа ідентичних положень між двома послідовностями при порівнянні, і діленням цього числа на число порівнюваних положень і множенням отриманого результату на 100 для того, щоб одержати відсоток ідентичності між цими двома послідовностями.

Термін "клітина" або "клітина-хазяїн" переважно стосується інтактної клітини, тобто клітини з інтактною мембраною, яка не "випускає" свої нормальні внутрішньоклітинні компоненти, такі як ферменти, органели або генетичний матеріал. Інтактна клітина бажано є життєздатною клітиною, тобто живою клітиною, здатною здійснювати свої нормальні метаболічні функції. Переважно зазначений термін, як він використовується у даному винаході, відноситься до будь-якої клітини, яка може бути трансфікована екзогенною нуклеїновою кислотою. Бажано, клітина, трансфікована екзогенною нуклеїновою кислотою й перенесена реципієнтові, може експресувати нуклеїнову кислоту в реципієнта. Термін "клітина" включає бактеріальні клітини; іншими придатними клітинами є клітини дріжджів, клітини грибів або клітини ссавців. Придатні бактеріальні клітини включають клітини грамнегативних бактеріальних штамів, таких як штами *Escherichia coli*, *Proteus* і *Pseudomonas*, і грампозитивних бактеріальних штамів, таких як штами *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* і *Lactococcus*. Придатні грибкові клітини включають клітини видів *Trichoderma*, *Neurospora* і *Aspergillus*. Придатні клітини дріжджів включають клітини видів *Saccharomyces* (наприклад, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (наприклад, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (наприклад, *Pichia pastoris* і *Pichia methanolicus*), і *Hansenula*. Придатні клітини ссавців включають, наприклад, CHO клітини, BHK клітини, Hela клітини, COS клітини, 293 HEK тощо. Однак, так само можуть використовуватися клітини амфібій, комах, рослин і будь-які інші клітини, які використовуються в даній галузі техніки для експресії гетерологічних білків. Клітини ссавців є найкращими для адаптивного переносу, наприклад, клітини людини, миші, хом'яка, свині, кози й приматів. Клітини можуть бути отримані з великої кількості типів тканин і включають первинні клітини й клітинні лінії, такі як клітини імунної системи, зокрема, антиген-презентуючі клітини, такі як дендритні клітини й Т-клітини, стовбурові клітини, такі як гематопоетичні стовбурові клітини й мезенхімальні стовбурові клітини й інші типи клітин. Антиген-презентуюча клітина – це клітина, яка експонує антиген у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності на своїй поверхні. Т-клітини можуть розпізнавати цей комплекс за допомогою Т-клітинного рецептора (TCR).

Термін "трансгенна тварина" відноситься до тварини, яка має геном, що містить один або кілька трансгенів, бажано трансгенів важкого й/або легкого ланцюга, або трансхромосом (або інтегрованих або неінтегрованих у природну геномну ДНК тварини), бажано здатних експресувати трансгени. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген людського легкого ланцюга й/або трансген людського важкого ланцюга або трансхромосому людського важкого ланцюга, так що миша продукує людські анти-CLDN6 антитіла, коли вона імунізована CLDN6-антигеном й/або клітинами, які експресують CLDN6. Трансген людського важкого ланцюга може бути інтегрований у хромосому ДНК миші, як у випадку трансгенної миші, наприклад, HuMAb миші, наприклад HCo7 або HCo12 миші, або трансген людського важкого ланцюга може бути збережений екстрахромосомно, як у випадку трансхромосомних (наприклад, KM) мишей, як описано в WO 02/43478. Такі трансгенні й трансхромосомні миші можуть бути здатні продукувати багато ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN6 (наприклад, IgG, IgA й/або IgE) при проведенні V-D-J рекомбінації й перемикання ізотипа.

"Зменшувати", "знижувати" або "інгібувати" при використанні в описі означає здатність викликати загальне зменшення, бажано на 5 % або більше, 10 % або більше, 20 % або більше, ще краще 50 % або більше й найкраще на 75 % або більше рівня, наприклад, рівня експресії або рівня проліферації клітин.

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

Незважаючи на те, що наступний опис пропонує обговорення, стосовно механізму, який лежить в основі терапевтичної ефективності антитіл, воно не повинне розглядатися як таке, що обмежує винахід жодним чином.

Описані тут антитіла переважно взаємодіють із компонентами імунної системи, бажано

через ADCC або CDC. Описані в цьому документі антитіла також можуть використовуватися для "цільового навантаження" (наприклад, радіоізотопами, лікарськими засобами або токсинами), для того, щоб безпосередньо вбивати пухлинні клітини, або можуть використовуватися синергічно разом із традиційними хіміотерапевтичними засобами, впливаючи на пухлини за допомогою додаткових механізмів дії, включаючи протипухлинні імунні відповіді, які можуть бути порушені через побічні цитотоксичних ефектів хіміотерапевтичних препаратів на Т-лімфоцити. Однак, описані тут антитіла також можуть проявляти вплив просто шляхом зв'язування з CLDN6 на клітинній поверхні, таким чином, наприклад, блокуючи проліферацію клітин.

Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність

ADCC описує здатність ефекторних клітин, зокрема, лімфоцитів, убивати клітини, при цьому необхідно, щоб клітина-мішень була позначена антитілом.

Переважаю ADCC відбувається, коли антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних клітинах, а Fc-домени антитіл зв'язують Fc-рецептори (FcR) на поверхні імунних ефекторних клітин. Було встановлено кілька родин Fc-рецепторів, при цьому характерно, що специфічні популяції клітин експресують певні Fc-рецептори. ADCC можна розглядати як механізм прямого руйнування (різного ступеню) пухлини, який призводить до презентування антигену й індукції Т-клітинних відповідей, спрямованих на пухлину. Бажано індукція ADCC in vivo буде викликати Т-клітинні відповіді, спрямовані на пухлинні клітини і відповіді антитіл хазяїна.

Комплементзалежна цитотоксичність

Іншим способом знищення клітин, який може бути опосередкований антитілами, є CDC. Найефективнішим ізотипом для активації комплементу є IgM. Також дуже ефективними при спрямовуванні CDC класичним шляхом активації комплементу є IgG1 і IgG3. Бажано, утворення комплексів антиген-антитіло в цьому каскаді приводить до "розкриття" численних місць зв'язування C1q у безпосередній близькості на CH2 доменах задіяних молекул антитіл, наприклад, молекул IgG (C1q є одним із трьох субкомпонентів комплементу C1). Бажано ці "розкриті" місця зв'язування C1q перетворюють взаємодію C1q-IgG, до цього з низькою спорідненістю, на спорідненість із високою авідністю, що запускає каскад подій, які залучають ряд інших білків комплементу, і приводить до протеолітичного вивільнення хемотаксичних/активуючих агентів ефекторних клітин C3a і C5a. Бажано каскад комплементу закінчується утворенням мембрано-атакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, що сприяють вільному проходженню води й розчинених речовин у клітину й із клітини.

Описані в цьому документі антитіла можна одержати за допомогою ряду методів, включаючи звичайну методику одержання моноклональних антитіл, наприклад, методом гібридизації стандартних соматичних клітин Kohler і Milstein, Nature 256: 495 (1975). Незважаючи на те, що методи гібридизації соматичних клітин є кращими, у принципі можна використовувати інші методи одержання моноклональних антитіл, наприклад, шляхом вірусної або онкогенної трансформації В-лімфоцитів, або метод фагового дисплея з використанням бібліотек генів антитіл.

Кращою тваринною системою для одержання гібридоми, яка секретує моноклональні антитіла, є мишача система. Одержання гібридоми в миші є загальноприйнятим методом. Протоколи імунізації й методики виділення імунізованих спленоцитів для злиття добре відомі в даній галузі техніки. Клітини, що зливаються (наприклад, мишачі клітини міеломи) і процедури злиття також добре відомі.

Іншими кращими тваринними системами для одержання гібридом, які секретують моноклональні антитіла, є пацюки або кролики (наприклад, система, описана в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), дивися також Rossi et al., Am. J. Clin. 35 Pathol. 124:295(2005)).

В іншому кращому варіанті здійснення людські моноклональні антитіла можна одержати за допомогою трансгенних або трансхромосомних мишей, які несуть частини людської імунної системи, а не мишачої системи. Ці трансгенні або трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HuMAb і миші KM, відповідно, і разом згадуються в описі як "трансгенні миші". Одержання людських антитіл у таких трансгенних мишах можна здійснити, як докладно описано для CD20 в WO2004 035607.

Іншою стратегією одержання моноклональних антитіл є пряме виділення генів, які кодують антитіла, з лімфоцитів, які продукують антитіла, наприклад, дивися Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Подобиці розробки рекомбінантних антитіл дивися також в Welschof і Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 і Benny K.C. Lo Antibodi Engineering ISBN 1-58829-092-1.

З метою одержання антитіл мишей можна імунізувати кон'югованими з носієм пептидами, отриманими з послідовності антигену, тобто послідовності, проти якої спрямовані антитіла, збагаченим препаратом рекомбінантно експресованого антигену або його фрагментів і/або клітинами, які експресують антиген, як це було описано. Альтернативно, мишей можна імунізувати ДНК, що кодує антиген або його фрагменти. У тому випадку, коли імунізація з використанням очищеного або збагаченого препарату антигену не призводить до утворення антитіл, мишей також можна імунізувати клітинами, які експресують антиген, наприклад, клітинною лінією, щоб викликати імунну відповідь.

Імунну відповідь можна контролювати протягом виконання протоколу імунізації, відбираючи зразки плазми й сироватки із хвостової вени або шляхом ретроорбітальної кровотечі. Миші з достатнім титром імуноглобуліну можуть використовуватися для злиття. Мишей можна піддати стимуляції внутрішньоочеревинно й внутрішньовенно клітинами, які експресують антиген, за 3 дні до забою й видалення селезінки, для того, щоб збільшити швидкість секретування специфічних антитіл гібридомами.

Для одержання гібридом, які продукують моноклональні антитіла, з лімфатичних вузлів або селезінки, отриманих від імунізованих мишей, можуть бути виділені клітини й злиті з придатною іморталізованою клітинною лінією, наприклад, лінією клітин мієломи миші. Потім, отримані гібридами можна відібрати за виробленням антиген-специфічних антитіл. Потім за допомогою методу ELISA можна відібрати окремі комірочки з гібридомами, які секретують антитіла. За допомогою імунофлуоресценції й FACS-аналізу з використанням клітин, які експресують антиген, можна встановити антитіла зі специфічністю до антигену. Гібридами, які секретують антитіла, можна знову висіювати, провести відбір і позитивні за моноклональними антитілами можна субклонувати за допомогою серійного розведення. Потім стабільні субклони культивують *in vitro* у середовищі для культури тканин, щоб одержати й охарактеризувати антитіла.

Антитіла також можна одержати в клітинах-хазяїнах, таких як, трансфектоми, використовуючи, наприклад, комбінацію методів рекомбінантних ДНК і методів трансфекції генів, добре відомих у даній галузі техніки (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

Наприклад, в одному варіанті здійснення гени(ген), які представляють інтерес, наприклад, гени антитіл, можуть бути ліговані у вектор експресії, такий як еукаріотична експресуюча плазмідна, наприклад, використовувана системою експресії гена GS, розкритою в WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або інші системи експресії, добре відомі в даній галузі. Очищена плазмідна із клонованими генами антитіла може бути введена в еукаріотичну клітину-хазяїна, таку як CHO-клітини (клітини яєчників китайського хом'ячка), NS/O клітини, HEK293T клітини або HEK293 клітини або альтернативно в інші еукаріотичні клітини, такі як клітини рослин, грибів або дріжджів. Для введення цих генів можуть використовуватися методи, описані в даній галузі техніки, такі як електропорація, ліпофектин, ліпофектамін або інші. Після введення цих генів антитіл у клітини-хазяїни, клітини, які експресують антитіло, можуть бути розпізнані й відібрані. Ці клітини є трансфектомами, які потім можна ампліфікувати і масштабувати для вироблення антитіл. Рекомбінантні антитіла можуть бути ізольовані й очищені із цих культуральних супернатантів і/або клітин.

Альтернативно, клоновані гени антитіла можуть бути експресовані в інших системах експресії, включаючи прокаріотичні клітини, такі як мікроорганізми, наприклад, *E. coli*. Більше того, антитіла можуть продукуватися в трансгенних організмах, які не є людиною, і бути присутніми, наприклад, у молоці овець і кроликів або в яйцях курей, або в трансгенних рослинах; дивися, наприклад, 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 антитіла є високо імуногенними для людини, що приводить до зменшення терапевтичного ефекту при повторному застосуванні. Основна імуногенність опосередкована константними областями важкого ланцюга. Імуногенність мишачих антитіл у людини можна зменшити або повністю її уникнути, якщо відповідні антитіла зробити химерними або гуманізованими. Химерні антитіла є антитілами, різні частини яких походять від різних видів тварин, наприклад, антитіла мають варіабельну область, отриману від мишачого антитіла, і константну область людського імуноглобуліну. Химеризація антитіл досягається об'єднанням варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів мишачих антитіл з людською константною областю важкого й легкого ланцюга (наприклад, як описано Kraus et al., в *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). У кращому варіанті здійснення химерні антитіла одержують з'єднанням людської константної області каппа-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. У ще одному кращому варіанті здійснення химерні антитіла одержують з'єднанням людської константної області лямбда-

легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. Кращими константними областями важкого ланцюга для одержання химерних антитіл є IgG1, IgG3 і IgG4. Іншими кращими константними областями важкого ланцюга для одержання химерних антитіл є IgG2, IgA, IgD і IgM.

5 Гуманізація

Антитіла взаємодіють із цільовими антигенами переважно через амінокислотні залишки, розташовані в шести гіперваріабельних ділянках (CDR) важкого й легкого ланцюга. Із цієї причини амінокислотні послідовності в CDR більш відрізняються у окремих антитіл, ніж послідовності за межами CDR. Оскільки CDR-послідовності відповідають за більшість взаємодій антитіло-антиген, є можливою експресія рекомбінантних антитіл, що наслідують властивості специфічних природних антитіл, шляхом конструювання векторів експресії, які включають CDR-послідовності від специфічних природних антитіл, пересажені на каркасні послідовності від іншого антитіла з іншими властивостями (див., наприклад, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525; і Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). Такі каркасні послідовності можна одержати з публічних баз даних ДНК, які містять зародкові послідовності генів антитіл. Ці зародкові послідовності будуть відрізнятися від зрілих послідовностей генів антитіл, оскільки вони не містять повністю зібраних генів варіабельних областей, які утворюються шляхом з'єднання ділянок V-(D)-J при дозріванні В-клітин. Зародкові послідовності генів також відрізняються від послідовностей високоафінних антитіл із вторинного репертуару індивідуума рівномірно по всій варіабельній області.

Здатність антитіл до зв'язування з антигеном можна встановити за допомогою стандартних методів аналізу зв'язування (наприклад, ELISA, вестерн-блотинга, імунофлуоресценції й проточної цитометрії).

Для виділення антитіл відібрані гібридами вирощують у дволітровій ролерній колбі. Альтернативно антитіла можна одержати в біореакторі на основі діалізу. За необхідності супернатанти можна профільтрувати, концентрувати перед проведенням афінної хроматографії із протеїн-G-сефарозою або протеїн-A-сефарозою. Чистоту елюйованого IgG можна проконтролювати за допомогою гель-електрофореза й високоефективної рідинної хроматографії. Буферний розчин можна поміняти на PBS, а концентрацію можна визначити при OD280 з використанням коефіцієнта екстинції 1,43. Моноклональні антитіла можна розділити на аліквати і зберігати при -80 °C.

Для того щоб визначити, чи зв'язуються відібрані моноклональні антитіла з одним епітопом, може бути застосований сайт-спрямований або мульти-сайт-спрямований мутагенез.

Для встановлення ізотипа очищених антитіл може бути проведений аналіз ELISA з різними комерційними наборами (наприклад, Zymed, Roche Diagnostics). Кмірки титраційних мікропланшетів покривали антимишачим Ig. Після блокування (інгібування) проводили реакцію з моноклональними антитілами або очищеними ізотиповими контролями за кімнатної температури протягом двох годин. Потім проводили реакцію або з мишачим IgG1, IgG2a, IgG2b або IgG3, IgA або зі специфічним мишачим IgM, кон'югованим з пероксидазою. Після промивання планшети обробляли ABTS субстратом (1 мг/мл) і досліджували при OD 405-650. Альтернативно, можна використовувати набір для ізотипування Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027), як описано виробником.

Для того щоб продемонструвати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати проточну цитометрію. Лінії клітин, які експресують антиген у нормі або після трансфекції, і негативні контролі, що втратили експресію антигену (вирощені за стандартних умов), змішують із різними концентраціями моноклональних антитіл у супернатантах від гібридом або в PBS, що містить 1 % FBS, та інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Після промивання мічені APC або Alexa647 анти-IgG антитіла можуть зв'язуватися з антиген-зв'язаними моноклональними антитілами за таких же умов, як умови для фарбування первинних антитіл. Зразки можна проаналізувати за допомогою проточної цитометрії на приладі FACS, використовуючи параметри прямого й бічного розсіювання світла, щоб пропускати окремі живі клітини. Для того щоб відрізнити антиген-специфічні моноклональні антитіла від неспецифічних з'єднувальних речовин у ході окремого вимірювання, можна використовувати метод котрансфекції. Клітини тимчасово трансфіковані плазмідами, які кодують антиген і флуоресцентний маркер, можна пофарбувати, як описано вище. Трансфіковані клітини можна виявити в іншому діапазоні флуоресценції, ніж клітини, пофарбовані антитілом. Оскільки більшість трансфікованих клітин експресують обидва трансгени, антиген-специфічні моноклональні антитіла зв'язуються переважно із клітинами, які експресують флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються в співрозмірному співвідношенні з

нетрансфікованими клітинами. Можна застосовувати альтернативний метод аналізу з використанням флуоресцентної мікроскопії на додачу до або замість проточної цитометрії. Клітини можна пофарбувати так, як описано вище, і досліджувати за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Для того щоб продемонструвати наявність антитіл у сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують антиген, можна використовувати імунофлуоресцентну мікроскопію. Наприклад, клітинні лінії, які експресують антиген або спонтанно або після трансфекції, і негативні контролю, що втратили експресію антигену, вирощують на предметних скельцях з комірками за стандартних умов росту в середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FCS), 2 mM L-глутаміну, 100 мкг/мл пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Потім клітини фіксують метанолом або параформальдегідом або залишають необробленими. Потім проводили реакцію клітин з моноклональними антитілами до антигену протягом 30 хвилин при 25 °C. Після промивання проводять реакцію клітин з міченими Alexa555 вторинними антитілами до IgG миші (Molecular Probes) за тих же самих умов. Після цього можна досліджувати клітини за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Із клітин, які експресують антиген, та відповідних негативних контролів можна приготувати клітинні екстракти, а потім провести електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS). Після електрофорезу виділені антигени переносять на нітроцелюлозні мембрани, інгібують і досліджують за допомогою моноклональних антитіл, які можна протестувати. IgG-зв'язування можна визначити за допомогою антимишачого IgG, міченого пероксидазою, і виявити за допомогою ECL субстрату.

Антитіла можна додатково протестувати щодо реакційної здатності із антигеном за допомогою імуногістохімічного аналізу добре відомим фахівцеві в даній галузі способом, наприклад, з використанням кріозрізів, фіксованих параформальдегідом або ацетоном, або фіксованих параформальдегідом парафінових зрізів зразків неракових тканин або ракових тканин, узятих у пацієнта під час звичайних хірургічних процедур, або в мишей із ксенотрансплантатом пухлин, інокульованих за допомогою ліній клітин, які експресують антиген спонтанно або після трансфекції. Для імунофарбування антитіла, що реагують із антигеном, можуть бути проінкубовані, а потім кон'юговані з міченими пероксидазою хрину козячими антимишачими або козячими антикроликовими антитілами (DAKO) згідно з інструкціями продавця.

Антитіла можна протестувати щодо здатності їх опосередковувати фагоцитоз і знищення клітин, які експресують CLDN6. Перевірка активності моноклональних антитіл *in vitro* забезпечує первинний скринінг до тестування на моделях *in vivo*.

Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC)

Коротко, поліморфноядерні клітини (PMN), NK-клітини, моноцити, мононуклеарні клітини або інші ефекторні клітини від здорових донорів можна очистити центрифугуванням у градієнті щільності фікол-гіпака, з наступним руйнуванням забруднюючих еритроцитів. Промиті ефекторні клітини суспендують в RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки або альтернативно з 5 % інактивованої нагріванням людської сироватки й змішують із ⁵¹Cr-міченими клітинами-мішенями, які експресують CLDN6, у різних співвідношеннях ефекторних клітин із клітинами-мішенями. Альтернативно, клітини-мішені можна позначити лігандом, який посилює флуоресценцію (BATDA). Високо флуоресцентний хелат європію з посилюючим лігандом, який вивільняється з мертвих клітин, можна визначити за допомогою флуориметра. В іншому альтернативному способі може використовуватися трансфекція клітин-мішеней з використанням люциферази. При цьому доданий люцифер жовтий може окислюватися тільки живими клітинами. Потім можна додати очищені анти-CLDN6 IgG у різних концентраціях. Як негативний контроль можна використовувати нерелевантний людський IgG. Дослідження проводиться протягом від 4 до 20 годин при 37 °C залежно від типу використаних ефекторних клітин. Цитоліз у зразках можна оцінити шляхом вимірювання вивільнення ⁵¹Cr або наявності хелата EuTDA у культуральному супернатанті. Альтернативно, можна виміряти люмінесценцію живих клітин, що є результатом окиснення люцифера жовтого.

Також можна перевірити різні комбінації анти-CLDN6 моноклональних антитіл, щоб визначити чи підсилюється цитоліз при дії складів моноклональних антитіл.

Комплементзалежна цитотоксичність (CDC)

Моноклональні анти-CLDN6 антитіла можна перевірити щодо їх здатності опосередковувати CDC за допомогою ряду відомих методів. Наприклад, сироватку для одержання комплекменту можна одержати із крові відомим фахівцям способом. Для визначення CDC-активності моноклональних антитіл можна використовувати різні методи. Наприклад, можна виміряти

вивільнення ^{51}Cr або можна оцінити підвищену проникність мембран за допомогою методу виключення пропідіум йодиду (PI). Коротко, цільові клітини промивають і $5 \times 10^5/\text{мл}$ інкубують з різними концентраціями mMAb протягом 10-30 хвилин за кімнатної температури або при 37°C . Потім додають сироватку або плазму до остаточної концентрації 20 % (об./об.) і клітини інкубують при 37°C протягом 20-30 хвилин. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI у пробірку для FACS-аналізу. Після цього суміш негайно аналізують за допомогою проточної цитометрії, використовуючи FACS-набір.

В альтернативному способі дослідження індукції CDC можна встановити на прикріплених клітинах. В одному варіанті здійснення цього методу аналізу клітини висівають за 24 години до дослідження із щільністю $3 \times 10^4/\text{комірку}$ в плоскодонні титраційні мікропланшети для культур тканин. Наступного дня ростове середовище видаляють і клітини інкубують з антитілами (три повторності). Контрольні клітини інкубують у ростовому середовищі або ростовому середовищі, яке містить 0,2 % сапоніну, для визначення фонового лізису й максимального лізису, відповідно. Після інкубації протягом 20 хвилин за кімнатної температури супернатант видаляють, і додають до клітин 20 % (об./об.) людської плазми або сироватки в DMEM (попередньо нагрітої до 37°C) і інкубують протягом наступних 20 хвилин при 37°C . До клітин кожного зразка додають розчин пропідію йодиду (10 мкг/мл). Потім супернатанти заміняють PBS, що містять 2,5 мкг/мл етидію броміду, і вимірюють випущення флуоресценції після порушення при 520 нм при 600 нм за допомогою Tecan Satire. Відсоток специфічного лізису обчислюють, як зазначено далі: % специфічного лізису = (флуоресценція зразка - фонова флуоресценція) / (флуоресценція при максимальному лізисі - фонова флуоресценція) $\times 100$.

Індукція апоптозу й інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами

Наприклад, щоб перевірити здатність моноклональних анти-CLDN6 антитіл ініціювати апоптоз, їх можна інкубувати із CLDN6-позитивними пухлинними клітинами або CLDN6-трансфікованими пухлинними клітинами при 37°C протягом приблизно 20 годин. Клітини збирають, промивають в анексин-V з'єднувальному буфері (BD biosciences), і інкубують з анексином V, з'єднаним з FITC, або APC (BD biosciences), протягом 15 хвилин у темряві. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI (10 мкг/мл в PBS) у пробірку для FACS-аналізу й відразу оцінюють за допомогою проточної цитометрії (як описано вище). Альтернативно, загальне інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами можна визначити за допомогою комерційно доступних наборів. За допомогою набору для визначення клітинної проліферації DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) можна провести неізотопний імуноаналіз у мікропланшетах, заснований на вимірюванні включення 5-бром-2'-дезоксидуридину (BrdU) під час синтезу ДНК проліферуючими клітинами. Включений BrdU визначають за допомогою мічених європієм моноклональних антитіл. Щоб зробити можливим виявлення антитіл, клітини фіксують і проводять денатурацію ДНК, використовуючи Fix (фіксує) розчин. Незв'язані антитіла змивають і додають у розчин індуктор DELFIA, щоб відокремити іони європію від мічених антитіл, де вони утворюють високо флуоресцентні хелати з компонентами індуктора DELFIA. Флуоресценція, визначена в кожній комірці за допомогою флуориметрії з часовим розрізненням, є пропорційною до синтезу ДНК у клітині.

Доклінічні дослідження

Зв'язувальні агенти, описані в цьому документі, також можуть бути протестовані на моделі *in vivo* (наприклад, на імунодефіцитних мишах із ксенотрансплантатами клітинних ліній пухлин, які експресують CLDN6, щоб визначити їхню ефективність щодо контролювання росту CLDN-експресуючих пухлинних клітин.

Дослідження антитіл винаходу *in vivo* можна провести після ксенотрансплантації пухлинних клітин, які експресують CLDN18.2, імунодефіцитним мишам або іншим тваринам. Щоб визначити дію антитіл на запобігання утворення пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлиною, антитіла можна ввести мишам, вільним від пухлини, з наступною ін'єкцією пухлинних клітин. Щоб установити терапевтичну ефективність відповідних антитіл відносно зменшення росту пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлиною, антитіла можна ввести мишам-носіям пухлин. Застосування антитіл можна комбінувати із застосуванням інших речовин, таких як цитостатичні засоби, інгібітори факторів росту, блокатори клітинного циклу, інгібітори ангиогенеза або іншими антитілами, щоб визначити синергійну ефективність і потенційну токсичність комбінацій. Щоб проаналізувати токсичні побічні явища, опосередковані антитілами, тваринам можна інокулювати антитіла або контрольні реагенти й ретельно вивчити симптоми, можливо пов'язані з терапією антитілами до CLDN6. Зокрема, можливі побічні явища від застосування *in vivo* CLDN6-антитіл включають токсичний вплив на тканини, які експресують CLDN6, включаючи шлунок. Антитіла, які розпізнають CLDN6 у людини й в інших видів, наприклад, мишей, є, зокрема, придатними для прогнозування можливих побічних явищ, опосередкованих

застосуванням моноклональних CLDN6-антитіл, у людей.

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

Сполуки й засоби, описані в даному документі, можуть бути введені у вигляді будь-якої придатної фармацевтичної композиції.

Фармацевтичні композиції винаходу бажано є стерильними й містять ефективну кількість антитіл, описаних у даному документі, і необов'язково додаткових засобів, описаних у даному документі, для того, щоб одержати бажану реакцію або бажаний ефект.

Фармацевтичними композиціями в більшості випадків надано стандартної лікарської форми і вони можуть бути отримані добре відомим способом. Наприклад, фармацевтична композиція може мати форму розчину або суспензії.

Фармацевтична композиція може містити солі, буферні речовини, консервуючі речовини, носії, розріджувачі й/або ексципієнти, кожен з яких бажано є прийнятним з погляду фармацевтики. Термін "фармацевтично прийнятний" відноситься до нетоксичної речовини, яка не втручається в дію активного компонента фармацевтичної композиції.

Солі, які не є фармацевтично прийнятними, можуть використовуватися для одержання фармацевтично прийнятних солей і включаються у винахід. Фармацевтично прийнятні солі даного типу включають, без обмеження, солі, отримані з наступних кислот: хлористоводневої, бромистоводневої, сірчаної, азотної, фосфорної, малеїнової, оцтової, саліцилової, лимонної, мурашиної, маленової, бурштинової та подібних до них. Фармацевтично прийнятні солі також можуть бути отримані у вигляді солей лужних або лужноземельних металів, таких як солі натрію, солі калію й солі кальцію.

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

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

Призначена для ін'єкцій композиція може містити фармацевтично прийнятний ексципієнт, такий як лактат Рінгера.

Термін "носій" стосується органічного або неорганічного компоненту, природного або синтетичного походження, з яким активний компонент поєднується, для того, щоб полегшити, підсилити або сприяти застосуванню. Відповідно до винаходу термін "носій" також включає один або кілька сумісних твердих або рідких наповнювачів, розріджувачів або інкапсулюючих речовин, придатних для введення пацієнтові.

Прийнятними для парентерального введення речовинами-носіями є, наприклад, стерильна вода, розчин Рінгера, лактат Рінгера, стерильний розчин хлориду натрію, поліалкіленгліколі, гідрогенезовані нафталіни й, зокрема, біологічно сумісні полімери лактиду, співполімери лактиду із гліколідом або співполімери поліоксиетилену з поліоксипропіленом.

Термін "ексципієнт", як він використовується в даному описі, позначає всі речовини, які можуть бути присутніми у фармацевтичній композиції й не є активними інгредієнтами, такі як, наприклад, носії, зв'язувальні речовини, змашувальні речовини, загущувальні речовини, поверхнево-активні речовини, консервуючі речовини, емульгуючі речовини, буферні речовини, ароматизуючі речовини або барвники.

Засоби й композиції, описані в даному документі, можуть вводитися будь-яким звичайним способом, наприклад, парентеральним шляхом, включаючи ін'єкцію або інфузію. Бажано введення здійснюється парентерально, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, підшкірно, внутрішньошкірно або внутрішньом'язево.

Композиції, придатні для парентерального введення, звичайно включають стерильні водні або неводні препарати активної сполуки, бажано ізотонічні щодо крові реципієнта. Прикладами сумісних носіїв і розчинників є розчин Рінгера й ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, стерильні, жирні олії використовуються як середовище для розчину або суспензії.

Засоби й композиції, описані в даному документі, вводяться в ефективних кількостях. "Ефективною кількістю" називається кількість, за допомогою якої досягається бажана реакція або бажаний ефект окремо або в комбінації з додатковими дозуваннями. У випадку лікування конкретної хвороби або конкретного стану бажана реакція переважно стосується інгібування розвитку хвороби. Сюди включається уповільнення розвитку хвороби й, зокрема, переривання або зворотній розвиток хвороби. Бажаною реакцією при лікуванні хвороби або стану також може бути затримка початку або запобігання початку зазначеної хвороби або зазначеного стану.

Зокрема, термін "ефективна кількість" відноситься до кількості (обсягу) терапії, достатнього, для того, щоб запобігти розвитку, рецидиву або виникненню раку та одного або кількох його симптомів, зменшення тяжкості, тривалості раку, полегшення одного або кількох симптомів раку, запобігання розвитку раку, а також для того, щоб викликати регресію раку й/або запобігти утворенню метастазів раку. В одному варіанті здійснення винаходу кількість терапії є ефективною для досягнення стабілізації, зменшення або знищення популяції ракових стовбурових клітин і/або усунення, знищення або контролювання первинного раку, метастатичного раку й/або рецидиву раку.

Ефективна кількість засобу або композиції, описаної в даному документі, буде залежати від стану, який необхідно лікувати, тяжкості захворювання, індивідуальних характеристик пацієнта, включаючи вік, фізіологічний стан, розмір і вагу, тривалість лікування, тип супутнього лікування (якщо воно є), конкретний спосіб введення й подібні фактори. Відповідно дозування введених описаних тут засобів можуть залежати від тих або інших подібних характеристик. У тому випадку, коли відповідь пацієнта є недостатньою при використанні перинного дозування, можуть використовуватися більш високі дози (або ефективно більш високі дози досягаються за допомогою іншого більш локального способу введення).

Засоби й композиції, описані в цьому документі, можуть вводитися пацієнтам з метою лікування або запобігання раковому захворюванню, наприклад, раковому захворюванню, яке характеризується наявністю ракових стовбурових клітин, які експресують CLDN6.

Засоби й композиції, запропоновані в даному документі, можуть використовуватися окремо або в комбінації із загальноприйнятими терапевтичними режимами, такими як хірургічне втручання, опромінення, хіміотерапія й/або трансплантація кісткового мозку (аутологічна, сингенна, алогенна або неспоріднена).

Лікування раку є такою галуззю, у якій стратегії комбінування є особливо доцільними, оскільки нерідко комбіноване застосування двох, трьох, чотирьох або навіть більше протипухлинних лікарських засобів/видів терапії приводить до появи синергійних ефектів, більш сильних у порівнянні з ефектами монотерапевтичного підходу. Таким чином, в іншому варіанті здійснення даного винаходу протипухлинна терапія може ефективно поєднуватися з різними іншими лікарськими засобами. До них належать, наприклад, комбінація із традиційними методами лікування пухлин, мультиепітопні стратегії, додаткова імунотерапія й терапевтичні підходи, націлені на ангиогенез або апоптоз (дивися, наприклад, Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11): 1735-1743.) Послідовне введення різних засобів може інгібувати ріст ракових клітин у різних контрольних точках, у той час як інші препарати можуть, наприклад, інгібувати неоангиогенез, виживання злоякісних клітин або метастазів, у результаті чого рак переводиться в хронічну форму хвороби. Наступний перелік надає кілька необмежувальних прикладів протипухлинних лікарських засобів і видів терапії, які можуть використовуватися в комбінації зі даним винаходом:

1. Хіміотерапія

Хіміотерапія є стандартом лікування для багатьох типів раку. Більшість загальноприйнятих хіміотерапевтичних засобів проявляє вплив, убиваючи клітини, які швидко діляться (швидкий поділ є однією з основних властивостей ракових клітин). Таким чином, комбінація із загальноприйнятими хіміотерапевтичними засобами, такими як, алкілюючі засоби, антиметаболіти, антрациклінові антибіотики, рослинні алкалоїди, інгібітори топоізомерази та інші протипухлинні засоби, які впливають на поділ клітин або синтез ДНК, може значно поліпшити терапевтичні ефекти даного винаходу шляхом усунення супресорних клітин, "перезавантаження" імунної системи, шляхом переведення клітин пухлин у стан більш чутливий до імуноопосередкованого знищення або шляхом додаткової активації клітин імунної системи. Синергійна протипухлинна дія хіміотерапевтичних препаратів і заснованих на вакцинації імунотерапевтичних засобів була продемонстрована в численних дослідженнях (дивися, наприклад, Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. Lancet Oncol. 12(12): 1125-33.; дивися також Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. J Biomed Biotechnol. 2010: 6920979; дивися також Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. Pancreas 38(3): e69-74). Існують сотні доступних хіміотерапевтичних засобів, які в принципі підходять для комбінованої терапії. Деякими (необмежувальними) прикладами хіміотерапевтичних засобів, які можуть бути поєднаними зі даним винаходом, є карбоплатин (параплатин), цисплатин (платинол, платинол-AQ), кризотиніб (ксалкори), циклофосфамід (цитоксан, Neosar),

доцетаксел (таксотер), доксорубіцин (адриаміцин), ерлотиніб (тарцева), етопозид (вепезид), фторурацил (5-ФУ), гемцитабін (гемзар), іматиніб мезилат (глівек), іринотекан (Camptosar), інкапсульований у ліпосоми доксорубіцин (Doxil), метотрексат (фолекс, мексат, аметоптерин), паклітаксел (таксол, абраксан), сорафініб (нексавар), сунітиніб (сунітент), топотекан (гікамтин), трабектидин (йонделіс), вінкрисдин (онковін, вінкасар PFS) і вінбластин (вельбан).

2. Хірургія

Хірургічне лікування раку - оперативне втручання з метою видалення пухлини – залишається основою протипухлинної терапії. Хірургічне лікування може бути поєднане з іншими видами протипухлинної терапії, для того щоб видалити решту пухлинних клітин. Комбінування хірургічних методів з наступним імунотерапевтичним лікуванням – це перспективний підхід, який був продемонстрований багато разів.

3. Променева терапія

Променева терапія залишається важливим компонентом протипухлинної терапії, причому приблизно 50 % усіх онкологічних пацієнтів одержують променеву терапію під час перебігу хвороби. Основна мета променевої терапії - позбавити ракові клітини можливості розмноження (клітинного поділу). Типи опромінення, які використовуються для лікування раку, є фотонним випромінюванням (X-промені й гамма-промені) і корпускулярним випромінюванням (пучками електронів, протонів і нейтронів). Існує два методи застосування опромінення в місці розташування злоякісного утворення. Зовнішня дистанційна променева терапія застосовується із зовні організму шляхом націлювання високоенергетичного випромінювання (фотонів, протонів або корпускулярного випромінювання) на місце розташування пухлини. Внутрішнє опромінення або брахітерапія застосовується з середини організму за допомогою радіоактивних джерел, які утримуються в катетерах або зернах, безпосередньо в місці розташування пухлини. Методами променевої терапії, які можуть бути застосовані в комбінації зі даним винаходом, є, наприклад, фракціонування (променева терапія, що застосовується в режимі поділу на фракції, наприклад, щоденні фракції 1,5-3 Грей, які проводяться протягом декількох тижнів), 3D конформна променева терапія (3DCRT; доставка опромінення в макроскопічний об'єм пухлини), променева терапія з модульованою інтенсивністю (IMRT; керована комп'ютером модуляція інтенсивності пучків багаторазового випромінювання), променева терапія під візуальним контролем (IGRT; метод, який включає попередню візуалізацію перед радіотерапією, що забезпечує можливість корекції) і стереотаксична променева терапія тіла (SBRT, доставляє дуже високі індивідуальні дози опромінення за допомогою декількох фракцій). Огляд, який стосується променевої терапії можна бачити тут Baskar et al. 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int. J Med Sci. 9(3): 193-199.

4. Антитіла

Антитіла (бажано моноклональні антитіла) здійснюють свою терапевтичну дію проти ракових клітин за допомогою різних механізмів. Вони впливають на індукцію апоптоза або запрограмованої загибелі клітин. Вони можуть блокувати компоненти шляхів сигнальної трансдукції, наприклад, такі як рецептори факторів росту, ефективно затримуючи проліферацію пухлинних клітин. У клітинах, які експресують моноклональні антитіла, вони можуть призводити до утворення антиідіотипових антитіл. Непрямі ефекти включають рекрутинг клітин, які проявляють цитотоксичність, таких як моноцити й макрофаги. Цей тип знищення клітин, опосередкований антитілами, називається антитілозалежною клітинноопосередкованою цитотоксичністю (ADCC). Антитіла також зв'язуються з комплементом, що приводить до прямої клітинної токсичності, відомої як комплементзалежна цитотоксичність (CDC). Комбінація хірургічних методів з імунотерапевтичними засобами або методами є перспективним підходом, як, наприклад, продемонстровано в Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-Cd20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4): 333-40. Наступний перелік надає деякі необмежувальні приклади протипухлинних антитіл і потенційних мішеней для антитіл (у дужках), які можуть використовуватися в комбінації зі даним винаходом: абаговомаб (CA-125), абциксимаб (CD41), адекватумаб (ЕрСAМ), афутузумаб (CD20), алацизумаб пегол (VEGFR2), алтумомаб пентетат (CEA), аматуксимаб (MORAb-009), анатумомаб мафенатокс (TAG-72), аполізумаб (HLA-DR), арцитумомаб (CEA), бавітуксимаб (фосфатиділсерин), бектумомаб (CD22), белімумаб (BAFF), бевацизумаб (VEGF-A), биватузумаб мертанзин (CD44 v6), блінатумомаб (CD19), брентуксимаб ведотин (CD30 TNFRSF8), кантузумаб мертанзин (муцин CanAg), кантузумаб равтанзин (MUC1), капромаб пендетид (клітини карциноми передміхурової залози), карлумаб (CNC0888), катумаксомаб (ЕрСAМ, CD3), цетуксимаб (EGFR), цитатузумаб богатокс (ЕрСAМ), циксутумумаб (IGF-1 рецептор), клаудиксимаб (клаудин), кліватузумаб тетраксетан (MUC1), конатумумаб (TRAIL-R2), дацетузамаб (CD40), далотузумаб (рецептор інсулін-подібного фактора росту I), денозумаб

(RANKL), детумомаб (клітини В-лімфоми), дрозитумаб (DR5), екроексимаб (GD3 гангліозид), едреколомаб (ЕрСAМ), елотузумаб (SLAMF7), енаватузумаб (PDL192), енситуksимаб (NPC-1C), епратузумаб (CD22), ертумаксимаб (HER2/неu, CD3), етарацизумаб (інтегрин $\alpha\beta 3$), фарлетузумаб (фолатний рецептор 1), FBT05 (CD20), фіклатузумаб (SCH 900105), 5 фігітумумаб (IGF-1 рецептор), фланвотумаб (глікопротеїн 75), фресоліумаб (TGF- β), галіксимаб (CD80), ганітумаб (IGF-I), гемтузумаб озогоміцин (CD33), гевокізумаб (IL-1 β), гірентуксимаб (карбоангідраза 9 (CA-IX)), глембатумумаб ведотин (GPNMB), ібрітумумаб тіуксетан (CD20), ікруцумаб (VEGFR-1), іговома (CA-125), індатуксимаб равтанзин (SDC1), інтетумумаб (CD51), інотузумаб озогоміцин (CD22), іпіліумаб (CD152), іратумумаб (CD30), 10 лабетузумаб (CEA), лексатумумаб (TRAIL-R2), лібівірумаб (поверхневий антиген гепатиту В), лінтузумаб (CD33), лорвотузумаб мертанзин (CD56), лукатумумаб (CD40), луміліксимаб (CD23), мапатумумаб (TRAIL-R1), матузумаб (EGFR), меполізумаб (IL-5), мілатузумаб (CD74), мітумумаб (GD3 гангліозид), могамулізумаб (CCR4), моксетумомаб пасудотокс (CD22), наколомаб тафенатокс (C242 антиген), наптумомаб естафенатокс (5T4), нарнатумаб (RON), 15 нецитумумаб (EGFR), німотузумаб (EGFR), ниволумаб (IgG4), офатумумаб (CD20), оларатумумаб (PDGF-R α), онартузумаб (розсіюючий фактор рецепторної кінази людини), опортузумаб монатокс (ЕрСAМ), ореговомаб (CA-125), окселумаб (OX-40), панітумумаб (EGFR), патритумаб (HER3), пемтумумаб (MUC1), пертузумаб (HER2/неu), пінтумумаб (антиген аденокарциноми), притумумаб (віментин), ракотумумаб (N-гліколілнейрамінова кислота), радретумаб (екстра 20 домен В фібронектину), рафівірумаб (глікопротеїн віруса сказу), рамуцирумаб (VEGFR2), рилотумумаб (HGF), ритуксимаб (CD20), робатумумаб (рецептор IGF-1), самалізумаб (CD200), сибротузумаб (FAP), силтуксимаб (IL-6), табалумаб (BAFF), такатузумаб тетраксетан (альфа-фетопропротеїн), таплітумумаб паптокс (CD19), тенатумумаб (тенасцин С), тепротумумаб (CD221), тицилііумаб (CTLA-4), тигатузумаб (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), тозитумумаб (CD20), 25 трастузумаб (HER2/неu), TRBS07 (GD2), тремеліумаб (CTLA-4), тукотузумаб целмолейкін (ЕрСAМ), ублітуксимаб (MS4A1), урелумаб (4-1BB), волоциксимаб (інтегрин $\alpha 5\beta 1$), волутумумаб (пухлинний антиген CTAА16.88), залутумумаб (EGFR), заноліумаб (CD4).

5. Цитокіни, хемокіни, костимулюючі молекули, гібридні білки

Комбіноване використання антиген-кодуючих фармацевтичних композицій даного винаходу 30 із цитокінами, хемокінами, костимулюючими молекулами й/або їх гібридними білками з метою індукції корисної імунomodulяції або ефекти інгібування пухлин - це інший варіант здійснення даного винаходу. З метою збільшення інфільтрації імунних клітин у пухлину й полегшення руху антиген-презентуючих клітин у пухлино-дренуючі лімфатичні вузли можуть використовуватися різні хемокіни з С, СС, СХС і СХ3С структурами. Деякими з найбільш перспективних хемокінів є, 35 наприклад, CCR7 і його ліганди CCL19 і CCL21, крім того CCL2, CCL3, CCL5 і CCL16. Іншими прикладами є CXCR4, CXCR7 і CXCL12. Більше того, використовуються костимулюючі або регуляторні молекули, такі як, наприклад, B7 ліганди (B7.1 і B7.2). Також використовуються інші цитокіни, такі як, наприклад, інтерлейкіни (наприклад, IL-1-IL17), інтерферони (наприклад, IFNальфа1, IFNальфа8, IFNальфа10, IFNальфа13, IFNальфа14, IFNальфа16, IFNальфа17, 40 IFNальфа21, IFNбета1, IFNW, IFNE1 і IFNK), гематopoетичні фактори, TGFs (наприклад, TGF- α , TGF- β та інші члени родини TGF) і, нарешті, члени родини рецепторів фактора некрозу пухлин та їх ліганди, а також інші стимулюючі молекули, включаючи, але не обмежуючись цим, 4-1BB, 4-1BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFRII, HVEM, 45 CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT і CD95 (Fas/APO-1), індукований глюкокортикоїдом TNFR-зв'язаний білок, пов'язаний з рецептором TNF білок (TRAMP), який опосередковує апоптоз і смертельний рецептор 6 (DR6). Особливо важливими мішенями для комбінованої імунотерапії є CD40/CD40L і OX40/OX40L внаслідок їхнього прямого впливу на виживання і проліферацію Т-клітин. Дивись огляд Lechner et al. 2011: Chemokines, 50 costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340.

6. Антибактеріальна обробка

Для знищення внутрішніх пухлин, збіднених киснем, дослідники використовують анаеробні бактерії, такі як Clostridium novyi. Надалі ці бактерії повинні загинути, коли вони входять у 55 контакт із окисгенованими областями пухлини, що означає, що вони безпечні для іншої частини організму. Іншою стратегією є використання анаеробних бактерій, які перетворюють за наявності ферменту, що може перетворити нетоксичні проліки на токсичний лікарський засіб. При проліферації цих бактерій у некротичній і гіпоксичній областях пухлини, фермент експресується винятково в пухлині. Таким чином, системно застосовані проліки 60 метаболізуються до токсичного лікарського засобу тільки в пухлині. Продемонстровано

ефективне застосування непатогенного анаероба *Clostridium sporogenes*.

7. Інгібітори кінази

Інша більша група потенційних мішеней для додаткової терапії раку включає інгібітори кіназ, оскільки ріст і виживання ракових клітин тісно пов'язані з порушенням регулювання активності кіназ. Для відновлення нормальної активності кіназ і, отже, зменшення росту пухлини використовується велика кількість інгібіторів. Група кіназ-мішеней включає рецепторні тирозинкінази, наприклад, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, цитоплазматичні тирозинкінази, наприклад, c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, серин/треонін кінази, наприклад, ATM, Aurora A & B, CDKs, mTOR, PKC α , PLKs, b-Raf, S6K, STK11/LKB1, і ліпідкінази, наприклад, PI3K, SK1. Низькомолекулярними інгібіторами кіназ є, наприклад, PHA-739358, нілотиніб, дазатиніб і PD166326, NSC 743411, лапатиніб (GW-572016), цанертиніб (CI-1033), семаксиніб (SU5416), ваталаніб (PTK787/ZK222584), сутент (SU11248), сорафеніб (BAY 43-9006) і лефлуномід (SU101). Для одержання додаткової інформації дивися, наприклад, Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9, 28-39.

8. Toll-подібні рецептори

Члени родини Toll-подібних рецепторів (TLRs) є важливою сполучною ланкою між вродженим і адаптивним імунітетом, причому ефект багатьох ад'ювантів ґрунтується на активації TLRs. Велика кількість загальноприйнятих вакцин проти раку включають ліганди для TLRs для стимулювання відповідей на вакцини. Крім TLR2, TLR3, TLR4, зокрема, для лікування раку з використанням пасивної імунотерапії були досліджені TLR7 і TLR 8. Близькоспоріднені TLR7 і TLR8 вносять вклад у протипухлинні відповіді, впливаючи на імунні клітини, пухлинні клітини й мікрооточення пухлини й можуть активуватися структурами, аналогічними до нуклеозидів. Усі TLR використовуються як окремі імунотерапевтичні засоби або ад'юванти для вакцин проти раку й можуть синергійно поєднуватися з композиціями й способами запропонованими даним винаходом. Для одержання додаткової інформації дивися van Duin et al. 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology*, 27(1):49-55.

9. Інгібітори ангіогенеза

На додачу до терапії, націленої на імуномодулюючі рецептори, уражені опосередкованими пухлиною механізмами уникнення й пригнічення імунітету, існують види терапії, націлені на середовище, яке оточує пухлину. Інгібітори ангіогенеза перешкоджають екстенсивному росту кровоносних судин (ангіогенезу), які необхідні для виживання пухлини. Ангіогенез, стимульований пухлинними клітинами для задоволення їх зростаючого споживання поживних речовин і кисню, може бути заблокований, наприклад, за допомогою різних таргентних молекул. Необмежувальними прикладами молекул, які опосередковують ангіогенез, або інгібіторів ангіогенеза, які можуть бути поєднані у даному винаході, є розчинний VEGF (VEGF ізоформи VEGF121 і VEGF165, рецептори VEGFR1, VEGFR2 і корецептори нейроплін-1 і нейроплін-2) 1 і NRP-1, ангіопоетин 2, TSP-1 і TSP-2, ангіостатин і споріднені молекули, ендостатин, вазостатин, калретикулін, тромбоцитарний фактор-4, TIMP і CD41, Meth-1 і Meth-2, IFN- α , - β і - γ , CXCL10, IL-4, -12 і -18, протромбін ("kringle"-домен-2), фрагмент антитромбіну III, пролактин, VEGI, SPARC, остеопонтин, маспін, канстатин, проліферин-зв'язаний протеїн, рестин і такі лікарські засоби, як, наприклад, бевацизумаб, ітраконазол, карбоксиаміотриазол, TNP-470, CM101, IFN- α , тромбоцитарний фактор-4, сурамін, SU5416, тромбоспондин, антагоністи VEGFR, ангіостатичні стероїди + гепарин, отриманий із хряща інгібуючий фактор ангіогенеза, інгібітори матричної металопротеїнази, 2-метоксиестрадіол, текогалан, тетратіомолібдат, талідомід, тромбоспондин, інгібітори пролактину α V β 3, ліномід, тасквінімод. Додаткову інформацію дивися в Schoenfeld and Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin.* (9):976-81.

10. Таргентна терапія низькомолекулярними лікарськими засобами

Низькомолекулярні лікарські засоби для таргентної терапії є в основному інгібіторами ферментативних доменів на мутованих, гіперекспресованих або інших особливо важливих білках усередині ракової клітини. Відомими й необмежувальними прикладами є інгібітори тирозинкіназ іматиніб (глівек) і гефітиніб (іресса). Використання малих молекул, наприклад, сунітиніб малату й/або сорафеніб тозилату, націлених на деякі кінази, у комбінації з вакцинами для лікування раку також описане в попередній патентній заявці US2009004213.

11. Вакцини на основі вірусів

Існує ряд протиракових вакцин на основі вірусів, доступних або таких, що наразі розробляються, які можуть використовуватися в комбінованому терапевтичному підході разом з композиціями запропонованими даним винаходом. Одним з переваг таких вірусних векторів є властива їм здатність ініціювати імунні відповіді, разом із запальними реакціями, які виникають у результаті вірусної інфекції, що викликає сигнал небезпеки, необхідний для активації імунітету.

Ідеальний вірусний вектор повинен бути безпечним і не повинен індукувати імунну відповідь проти вектора, щоб створити можливість для стимулювання специфічних протипухлинних відповідей. Рекombінантні віруси, такі як віруси коров'ячої віспи, віруси простого герпесу, аденовіруси, адено-асоційовані віруси, ретровіруси й авіпоксвіруси використовуються на тваринних пухлинних моделях, і, виходячи з їхніх обнадійливих результатів, проводяться клінічні випробування на людині. Особливо важливими вакцинами на основі вірусів є вірусоподобні частки (VLP), невеликі частки, які містять деякі білки із зовнішньої оболонки вірусу. Вірусоподобні частки не містять якого-небудь генетичного матеріалу з вірусу й не можуть викликати інфікування, однак вони можуть бути сконструйовані так, щоб на їхній оболонці був присутній пухлинний антиген. VLP можуть бути отримані з різних вірусів, наприклад, таких як вірус гепатиту В або інших родин вірусів, включаючи Parvoviridae (наприклад, адено-асоційований вірус), Retroviridae (наприклад, HIV) і Flaviviridae (наприклад, вірус гепатиту С). Огляд дивися в Sorensen and Thompson 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93; огляд вірусоподібних часток проти раку представлений в Buonaguro et al. 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83; і в Guillén et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128-133.

12. Мультиепітопні стратегії

Використання багатьох епітопів демонструє обнадійливі результати відносно вакцинації. Технології швидкого секвенування в комбінації із системами інтелектуальних алгоритмів надають можливість використання tumor mutanome і можуть забезпечити мультиепітопи для персоналізованих вакцин, які можуть поєднуватися із даним винаходом. Для одержання додаткової інформації дивися 2007: Vaccination of metastatic colorectal patient with cancers with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother 30: 762-772; furthermore Castle et al. 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 72 (5):1081-91.

13. Адоптивне Т-клітинне перенесення

Наприклад, комбінація вакцинації пухлинного антигену й Т-клітинного перенесення описана в: Rapoport et al. 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of htert and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97.

14. Таргентна терапія на основі пептидів

Пептиди можуть зв'язуватися з рецепторами клітинної поверхні або порушенням позаклітинним матриксом, що оточує пухлину. Радіонукліди, приєднані до цих пептидів (наприклад, RGDs), в остаточному підсумку вбивають ракову клітину, якщо нуклід розпадається поблизу від клітини. Великий інтерес, зокрема, представляють оліго- або мультимери цих з'єднувальних мотивів, оскільки це може призводити до підвищеної пухлинної специфічності й авідності. Необмежувальні приклади дивися в Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9): 1657-61.

15. Інші види терапії

Існують численні інші види терапії рака, які можна комбінувати зі даним винаходом з метою одержання синергійних ефектів. Необмежувальними прикладами є методи лікування, спрямовані на індукцію апоптоза, гіпертермія, гормональна терапія, терапія тіломеразою, терапія, посилена інсуліном, генна терапія й фотодинамічна терапія.

Для виявлення й/або визначення кількості клітин, які експресують CLDN6, можуть використовуватися різні методи, відомі в даній галузі техніки.

Наприклад, для виявлення експресії білка CLDN6 у клітинах або на клітинній поверхні можна використовувати імуноаналіз. Згідно із даним винаходом імуноаналізи включають, але не обмежуються цим, вестерн-блотинг, імуногістохімію, радіоімуноаналізи, твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), "сендвіч" імуноаналізи, аналізи імунопреципітації, реакції преципітації, реакції дифузійної преципітації в гелі, імунодифузні аналізи, реакції аглютинації, реакції зв'язування комплементу, кількісний радіоімуний аналіз, флуоресцентні імуноаналізи, імунофлуоресценція, імуноаналізи білка А, проточна цитометрія або FACS-аналіз.

В одному варіанті здійснення клітини зв'язуються з одним або кількома міченими антитілами, які мають здатність зв'язуватися з CLDN6, до виявлення й/або визначення кількості.

Альтернативно, може бути виявлена експресія мРНК CLDN6 або може бути визначена кількість мРНК CLDN6, для того, щоб виявити й/або визначити кількість клітин, які експресують CLDN6.

У деяких варіантах здійснення винаходу, зразком, отриманим від пацієнта, для виявлення й/або визначення кількості клітин, які експресують CLDN6, є біологічна рідина, включаючи, але

без обмеження, кров, кістковий мозок, сироватку, сечу або інтерстиціальну рідину. В інших варіантах здійснення зразок, отриманий від пацієнта, є зразком тканини (наприклад, матеріалом, отриманим при проведенні біопсії від суб'єкта, який має злоякісне новоутворення, або з підозрою на рак). Найкраще, зразок є зразком пухлини, отриманим за допомогою біопсії.

Відповідно до методів винаходу зразок може бути біологічним зразком, який пройшов одну або кілька стадій попередньої обробки до виявлення й/або визначення кількості клітин, які експресують CLDN6. У деяких варіантах здійснення біологічна рідина зазнає попередньої обробки центрифугуванням, фільтруванням, преципітацією, діалізом або хроматографією або комбінацією таких попередніх стадій. В інших варіантах здійснення зразок тканини зазнає попередньої обробки шляхом заморожування, хімічної фіксації, заливання в парафін, дегідратації, пермеабілізації або гомогенізації з подальшим центрифугуванням, фільтруванням, преципітацією, діалізом або хроматографією або комбінацією таких попередніх стадій.

Кількість ракових стовбурових клітин у зразку може бути виражена у вигляді відсотка, наприклад, від усіх клітин або всіх ракових клітин у зразку, або може бути зроблений кількісний аналіз відносно площі (наприклад, кількість клітин у полі зору), об'єму (наприклад, клітин на мл) або маси (наприклад, клітин на мг).

Кількість ракових стовбурових клітин у тестовому зразку можна порівняти з кількістю ракових стовбурових клітин в (а) контрольному зразку(ах). В одному варіанті здійснення контрольним зразком є зразок, отриманий від суб'єкта, який піддавався терапії в попередній момент часу (наприклад, до одержання терапії як вихідного контрольного зразка або в попередній момент часу одночасно з одержанням терапії). У цьому варіанті здійснення терапія бажано призводить до зменшення кількості ракових стовбурових клітин у тестовому зразку в порівнянні з контрольним зразком. В іншому варіанті здійснення контрольний зразок одержують від здорового суб'єкта, у якого рак не виявлений, або від пацієнта, у якого спостерігається ремісія раку такого ж типу. У цьому варіанті здійснення в результаті лікування бажано одержують тестовий зразок, який містить рівну або меншу, кількість ракових стовбурових клітин, ніж кількість ракових стовбурових клітин у контрольному зразку. В окремому варіанті здійснення стабілізація або зменшення кількості ракових стовбурових клітин відносно раніше встановленої кількості ракових стовбурових клітин у суб'єкта вказує на поліпшення прогнозу для суб'єкта або позитивна відповідь на терапію, у той час як збільшення відносно раніше встановленої кількості ракових стовбурових клітин вказує на той же самий або гірший прогноз і/або відсутність відповіді на терапію.

У деяких варіантах здійснення для того, щоб визначити кількість ракових стовбурових клітин у зразку, використовується комбінація маркерів клітинної поверхні, наприклад, CLDN6 у комбінації з іншими маркерами, типовими для ракових стовбурових клітин.

Даний винахід також пропонує набір, який містить один або кілька контейнерів, заповнених реагентами, призначеними для виявлення, визначення кількості або моніторингу клітин, які експресують CLDN6. В одному варіанті здійснення набір необов'язково містить інструкції, які стосуються застосування реагентів, призначених для визначення ракових стовбурових клітин або моніторингу ефективності протипухлинної терапії шляхом виявлення й/або визначення кількості клітин, які експресують CLDN6, зокрема, відносно використання реагентів у способах запропонованих винаходом. В одному варіанті здійснення набір містить засіб, який специфічно зв'язується з білком CLDN6 або CLDN6 мРНК. У деяких варіантах здійснення даний засіб є антитілом або фрагментом антитіла. В інших варіантах здійснення даний засіб є нуклеїновою кислотою. Що стосується виявлення нуклеїнової кислоти, набори звичайно містять (але без обмеження) зонди, специфічні для CLDN6 мРНК. Для проведення кількісної ПЛР набори, як правило, містять попередньо відібрані праймери, специфічні для послідовностей CLDN6 нуклеїнових кислот. Набори для проведення кількісної ПЛР також можуть містити ферменти, придатні для ампліфікації нуклеїнових кислот (наприклад, полімерази, такі як Taq), дезоксинуклеотиди й буфери, необхідні для реакційної суміші для ампліфікації. Набори для проведення кількісної ПЛР також можуть містити зонди, специфічні для послідовностей CLDN6 нуклеїнових кислот. У деяких варіантах здійснення набори для проведення кількісної ПЛР також містять компоненти, придатні для зворотного транскрибування РНК, включаючи ферменти (наприклад, зворотні транскриптази) і праймери для зворотної транскрипції разом з дезоксирибонуклеотидами й буферами, необхідними для реакції зворотної транскрипції.

У деяких варіантах здійснення засіб є міченим міткою, яку можна відслідковувати. Крім того, набори можуть містити інструкції, які стосуються здійснення аналізу, і методів інтерпретації й аналізу даних, отриманих у результаті проведення дослідження.

Виходячи з отриманих результатів (тобто чи присутні ракові стовбурові клітини, або чи є стабільною або зменшеною кількістю ракових стовбурових клітин) практикуючий лікар може

обрати ту або іншу терапію раку, наприклад, терапію раку, спрямовану проти ракових стовбурових клітин, або може продовжувати дану терапію. Альтернативно, виходячи з того результату, що ракові стовбурові клітини відсутні або їхня кількість не збільшується практикуючий лікар може вибрати застосування терапії рака, яка не спрямована проти ракових стовбурових клітин, або продовжити, змінити або припинити терапію.

У деяких варіантах здійснення даного винаходу, якщо зменшення популяції ракових стовбурових клітин було визначено як недостатнє після порівняння популяції ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від пацієнта, підданого терапії раку, зі зразком, отриманим раніше від пацієнта, тоді в практикуючого лікаря є деяка кількість варіантів для корегування лікування. Наприклад практикуючий лікар може далі збільшити дозування протипухлинної терапії, частоту введення, тривалість введення або будь-які їхні комбінації. В окремому варіанті здійснення після проведення дослідження може бути проведено додаткове лікування раку в пацієнта або замість першої терапії або в комбінації з першим видом лікування.

У деяких інших варіантах здійснення, якщо зменшення популяції ракових стовбурових клітин було визначено як прийнятне після порівняння популяції ракових стовбурових клітин у зразку, отриманому від пацієнта, підданого протипухлинній терапії, зі зразком, отриманим раніше від пацієнта практикуючий лікар може відмовитися від корегування терапії. Наприклад практикуючий лікар може відмовитися від збільшення дозування протипухлинної терапії, частоти введення, тривалості введення або будь-якої їхньої комбінації. Крім того практикуючий лікар може призначити додаткову терапію або комбінацію видів лікування.

Даний винахід додатково проілюстрований за допомогою наступних далі прикладів, які не повинні трактуватися як такі, що обмежують рамки винаходу.

Приклади

Приклад 1. CLDN6 експресується на поверхні людських індукованих плюрипотентних стовбурових клітин

Щоб перевірити, чи експресується CLDN6 у людських індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах (iPSc), аналізували експресію транскриптів CLDN6 у неонатальних HFF (фібробласти крайньої плоти людини, System Bioscience) у деякі моменти часу у ході лікування з використанням суміші для репрограмування (немодифікована суміш OSKMNL+EBK+miR, що складається з *in vitro* транскрибованої (IVT) РНК OSKMNL = транскрипційних факторів OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG і LIN28, IVT-RNA EBK=IFN-escape білків E3, K3 і B18R і miRNA суміші, що складається з miR-302a/b/c/d і 367; згідно із протоколом, описаним в PCT/EP2012/04673 або неправильно-трансфікованих HFFs (без РНК контролю) за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (qRT-PCR) з використанням секвенатора ABI PRISM 7300 і комп'ютерного забезпечення (Applied Biosystems) з використанням набору QuantiTect SYBR green Kit (Qiagen)). Клітини культивували в безсироваточному середовищі Nutristem (Stemgent, Cambridge (MA)) з додаванням 10 нг/мл bFGF і 0,5 мкМ Thiazovivin. Суміш для репрограмування була трансфікована за допомогою Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) у дні 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 і 11 експерименту. В контролі клітини обробляли тільки Lipofectamine RNAiMAX (без РНК контролю). Ми виявили явне майже 6000-разове збільшення експресії CLDN6 у порівнянні з необробленими HFF на 19 день після обробки, причому на 12 день після обробки ми спостерігали приблизно 2000-разове збільшення експресії CLDN6 (Фігура 1). Таким чином, CLDN6 експресується в людських індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах (iPSc).

Для перевірки наявності експресії CLDN6 на клітинній поверхні iPSc використовували проточну цитометрію. Враховуючи той факт, що iPSc ростуть на фідерних клітинах HFF, ми об'єднали даний аналіз із фарбуванням SSEA-4, загальноприйнятим маркером стовбурових клітин, щоб упевнитися в тому, що можливе специфічне виявлення iPScs. Із цією метою, клітини HFF, оброблені сумішшю для репрограмування або неправильним контролем (без РНК), збирали на 5, 12 і 19 день після лікування й фарбували 1 мкг/мл CLDN6-специфічними IMAB027-AF647 і 2 мкл SSEA-4 антитіл протягом 30 хвилин при 4 °C, поверхневу експресію аналізували за допомогою проточної цитометрії. До протоколу фарбування також був включений барвник для оцінки життєздатності Viability Dye 7-AAD з метою виключення мертвих клітин з наших аналізів. Експеримент був проведено два рази, з кожного зразка було зареєстровано 50,000 подій з використанням рідинного цитометра BD Canto II. Аналіз зареєстрованих клітин проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo Software, характерні точкові діаграми показано на Фігурі 2.

На 5 день CLDN6 не був виявлений на поверхні HFF, як при використанні суміші для репрограмування, так і без неї. Несподівано ми виявили, що SSEA-4 експресується на 15 % HFF, незалежно від того, чи була використана суміш для репрограмування чи ні. Це можна віднести за рахунок того факту, що використані HFF є неонатальними фібробластами й

можливо, що ці клітини зберігають деяку позитивність щодо SSEA-4. На 12 день після обробки близько 63 % оброблених HFF є позитивними щодо SSEA-4, крім того ми виявили CLDN6-SSEA-4 подвійну позитивну фракцію приблизно близько 15 %. На 15 день після обробки 15 % оброблених HFF є позитивними за CLDN6 і SSEA-4, представляючи окрему субпопуляцію.

5 Передбачається, що CLDN6-SSEA-4 позитивна субпопуляція маркує (відрізняє) тільки iPSc, тоді як CLDN6-SSEA-4 негативна субпопуляція розглядається як HFF фідерні клітини або нерепрограмовані клітини, а SSEA-4 окремі позитивні клітини є клітинами, які перебувають на початку репрограмування.

10 Було виявлено, що 15 % HFF клітин є позитивними за SSEA-4, але не за CLDN6, можна припустити, що CLDN6 є більш специфічним маркером для людських iPSc, ніж SSEA-4. SSEA-4 також експресується в неонатальних HFF, у той час як CLDN6, очевидно, специфічно експресується тільки в повністю репрограмованих HFF клітинах, які представляють фракцію iPSc.

Таким чином, CLDN6 специфічно експресується на поверхні людських iPSc.

15 Приклад 2. CLDN6 має важливе значення для колонієутворення клітин раку яєчника

Аналіз колонієутворення є ефективним способом дослідження CSC-подібних властивостей пухлинних клітин. За допомогою цього аналізу можна легко перевірити здатність до самовідновлення й потенційну можливість утворення пухлини окремими пухлинними клітинами. Щоб проаналізувати, чи відіграє CLDN6 роль в утворенні пухлини, ми вибрали, з одного боку, COV318, клітинну лінію раку яєчника, яка демонструє тільки субпопуляцію CLDN6-позитивних клітин, і з іншого боку, PA-1 однорідну лінію експресуючих CLDN6 клітин, які несуть стабільну лентивірусну коротку шпилькову РНК (shRNA), перетворену нокаутом CLDN6 (клони PA-1 50, PA-1 54); див. Фігура 3.

20 Клітини фарбували на CLDN6 за допомогою 1 мкг/мл IMAB027-AF647 протягом 30 хвилин при 4 °C і після цього сортували за допомогою FACS (сортування флуоресцентно-активованих клітин), використовуючи сортер клітин BD FACSAria, за експресією CLDN6. 500 (PA-1 50, PA-1 54) або 700 (COV318) клітин CLDN6-позитивної або CLDN6-негативної субпопуляції сортували безпосередньо в комірки 6-коміркових планшетів, а потім давали клітинам можливість рости протягом 14 днів, доти, поки не утворювалася достатня кількість колоній. Культуральне середовище міняли два рази на тиждень. Колонії фарбували й фіксували 0,5 % кристалічним фіолетовим в 10 % етанолі протягом 20 хвилин, три рази промивали дистильованою водою й висушували на повітрі. Робили знімки й підраховували кількість колоній "вручну". Колонією вважалось, щонайменше, 50 клітин. На Фігурі 4 показане характерне колонієутворення COV318 і CLDN6-нокаутних ліній клітин PA-1 50 і 54.

35 Досить цікавим є той факт, що CLDN6-негативні клітини демонструють значно більш низьку здатність до колонієутворення в порівнянні з CLDN6-позитивними клітинами в обох лініях клітин. На підставі цих результатів, ми робимо висновок, що CLDN6 відіграє важливу роль у здатності до колонієутворення, що є основною ознакою ракових стовбурових клітин.

40 Приклад 3. CLDN6 коекспресується з CSC маркерами CD24, CD90 і CD44 у клітинній лінії раку яєчника

Використання профілів експресії специфічних поверхневих маркерів – загальноприйнята стратегія ідентифікації й ізолювання CSCs із солідних пухлин і клітинних ліній. Поверхневі маркери, які, згідно з літературою, використовуються для ізолювання CSCs з раку яєчника, включають CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 і CD133. Для того щоб проаналізувати, чи можемо ми ідентифікувати CSC субпопуляції в клітинних лініях раку яєчника, які містять невелику субпопуляцію CLDN6-позитивних клітин, ми склали FACS панель, яка містить антитіла проти цих поверхневих маркерів (Таблиця 1)

45 Крім того, ми також включили антитіло для виявлення CLDN6 у панелі, щоб досліджувати процентне співвідношення колокалізації CLDN6 з надійно встановленими CSC-маркерами, тим самим оцінюючи потенційну можливість CLDN6 слугувати маркером для CSCs. З цією метою, 1Е6 клітини клітинної лінії COV318 фарбували протягом 30 хвилин при 4 °C зазначеними кількостями антитіл (дивися Таблицю 1), після чого клітини аналізували за допомогою проточної цитометрії щодо профілю експресії поверхневих маркерів. До протоколу фарбування також був включений барвник на життєздатність eFluor®506, для того, щоб виключити мертві клітини з наших аналізів. Експеримент був проведений тричі, з кожного зразка було зареєстровано 50,000 подій з використанням рідинного цитометра BD Canto II. Аналіз зареєстрованих клітин проводили з використанням програмного забезпечення Flowjo Software.

FACS-панель CSC

Поверхневий маркер	Кількість антитіла/Тест	Флуорохром антитіла
CD44	5мкл/ 100мкл тест	FITC
CD133/1	2мкл/ 100мкл тест	PE
CD90	2,5 мкл/ 100мкл тест	PerCP-Cy TM 5,5
CD117	1 мкг/ 100мкл біотин тест 0,05мкг/ 100мкл SA тест	APC-Cy7
CD34	5мкл/ 100мкл тест	Brilliant Violet TM 421
CD24	2мкл/ 100мкл тест	PE-Cy7
CLDN6	0,25мкл/ 100мкл тест	Alexa Fluor [®] 647
Живі/мертві	0,2мкл/ 200мкл PBS	eFluor [®] 506

Представлену FACS-панель, використовують для аналізу CSC маркера й експресії CLDN6 у клітинній лінії раку яєчника. Перераховані кількості антитіл, використані для відповідних маркерів, та відповідні флуорохроми.

FACS-аналіз підтвердив, що COV318 клітини експресують субпопуляції CSC маркерів CD44, CD90 і CD24, і що CLDN6 колокалізується, щонайменше, частково з усіма трьома маркерами (Фігура 5A). Потім ми використовували різні стратегії "гейтування" для підрахунку процентного співвідношення колокалізації всіх чотирьох маркерів. По-перше, ми підраховували відсоток CD44, CD24, CD90 і CLDN6 позитивних клітин у всій популяції життєздатних клітин. Ми виявили, що 0,18 % життєздатних клітин є позитивними за всіма чотирма маркерами. Потім, ми підраховували відсоток CD44, CD24 і CD90 позитивних клітин у популяції життєздатних клітин, які представляють CSC фракцію. Ми виявили, що 0,23 % клітин є позитивними за всіма чотирма маркерами при визначенні відносно всієї популяції життєздатних клітин, тоді як у тому випадку, коли вони співвідносяться з CLDN6-позитивною субпопуляцією, ми виявили, що фракція 20,1 % клітин є тричі позитивною, демонструючи 87-разову концентрацію трьох маркерів в CLDN6-позитивній субфракції. На останньому етапі ми підраховували відсоток CLDN6-позитивних клітин з одного боку у всій популяції життєздатних клітин, а з іншого боку в CD44/CD24/CD90 позитивній субпопуляції. Ми виявили, що концентрація CLDN6-експресуючих клітин становить від 0,91 % у всій клітинній популяції до 66,87 % в CSC фракції, демонструючи 74-разове збільшення (Фігура 5B).

Разом узяті, ці дані показують, що CLDN6 накопичується в CSC фракції й навпаки CSC маркери присутні в більшій кількості в CLDN6-позитивній субпопуляції. Ці результати показують, що CLDN6 є маркером CSCs.

Приклад 4. Збагачення CLDN6-експресуючих клітин приводить до нагромадження загальноприйнятих CSC маркерів CD44, CD24 і CD90

Було показано, що ізолювані із клітинних ліній і пухлин CSC-Фракції містять більшу кількість CSC маркерів, таких як CD44 і CD24. Щоб проаналізувати потенційну можливість CLDN6 слугувати новим маркером CSCs, ми досліджували, чи призводить ізолювання клітин CLDN6-позитивних фракцій з основної маси клітин до нагромадження загальноприйнятих оваріальних CSC маркерів.

З цією метою клітини COV318 фарбували 0,5 мкг/мл IMAB027 протягом 30 хвилин при 4 °C з наступною інкубацією з козячими вторинними антитілами до IgG людини (1:300) протягом 10 хвилин при 4 °C, після чого з COV318 клітин були виділені CLDN6-позитивні й CLDN6-негативні клітинні фракції за допомогою FACS сортування з використанням клітинного сортера BD FACSAria. Потім відібрані клітини розмножувалися протягом 10 днів за стандартних умов росту. 1Е6 клітини двох субпопуляцій фарбували для виявлення CSC маркерів CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 і CD133 протягом 30 хвилин при 4 °C (деталі дивися в Таблиці 1) і аналізували профіль експресії їх поверхневих маркерів за допомогою проточної цитометрії. Для кожного зразка реєстрували 50,000 подій з використанням проточного цитометра BD Canto II Flow Cytometer, аналіз підрахованих клітин, проводили, використовуючи програмне забезпечення Flowjo Software.

FACS-аналіз показав, що близько 50 % клітин CLDN6-позитивної відібраної фракції залишаються позитивними за CLDN6 після культивування за стандартних умов протягом 10 днів, тоді як CLDN6-негативні відібрані клітини - повністю негативними за CLDN6. Важливо відзначити, що ми виявили, що CLDN6-позитивна фракція демонструвала нагромадження CSC

маркерів CD44, CD24 і CD90 у порівнянні з CLDN6-негативною клітинною фракцією COV318 клітин. Характерні точкові діаграми різних зразків показано на Фігурі 6А. Додаткова кількісна оцінка рівнів експресії цих маркерів показала 99-разове збагачення CD44, 8-разове збагачення CD90 і 33-разове збагачення CD24 при порівнянні CLDN6-позитивної й CLDN6-негативної субпопуляцій (Фігура 6В).

Ці результати показують, що CLDN6 може використовуватися як селективний маркер для відділення CSC фракцій від основної маси клітин, демонструючи, що CLDN6 є новим CSC маркером.

Приклад 5. Лінії клітин з високою експресією CLDN6 демонструють збагачення CSC маркерів у порівнянні із клітинами з низькою експресією CLDN6

Було показано, що CLDN6 інтенсивно експресується в ембріонально-клітинних пухлинах, аденокарциномах яєчника й деяких видах рака із примітивним фенотипом. У випадку, коли CLDN6 є CSC маркером, ми могли очікувати нагромадження клітин з CSC-подібними характеристиками в подібних клітинних лініях або пухлинах і в такий спосіб нагромадження позитивних за CSC маркером клітин.

Ми досліджували чотири лінії клітин, які інтенсивно експресують CLDN6, клітинні лінії карциноми яєчника OV90 і PA-1 і клітинні лінії карциноми яєчка NEC-8 і NEC-14, щодо рівнів експресії загальноприйнятих CSC маркерів. З цією метою клітини 1Е6 кожної клітинної лінії фарбували на наявність поверхневих маркерів CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 і CD133, а також CLDN6 протягом 30 хвилин при 4 °C (подробіці див. у таблиці 1), після цього аналізували профілі експресії в клітинах за допомогою проточної цитометрії. Експерименти проводили по три рази. Для кожного зразка реєстрували 50,000 подій з використанням проточного цитометра BD Canto II Flow Cytometer, аналіз підрахованих клітин, проводили, використовуючи програмне забезпечення Flowjo Software. Мертві клітини були виключені з аналізу шляхом фарбування життєздатних клітин барвником eFluor®506. Характерні точкові діаграми для кожного зразка показано на Фігурі 7.

FACS аналізи підтвердили, що всі вивчені клітинні лінії приблизно на 95 % є позитивними за CLDN6. Як і очікувалося, ці клітинні лінії, які гіперекспресують CLDN6, крім CLDN6 також демонструють нагромадження загальноприйнятих CSC маркерів, причому OV90 клітини демонструють високу експресію CD44, CD133, CD24 і CD117, PA-1 клітини демонструють високу експресію CD44, CD133, CD90 і CD117, а NEC-8 і NEC-14 клітини демонструють підвищені рівні експресії маркерів CD133, CD90, CD24 і CD117.

Ці результати показують, що клітинні лінії, які гіперекспресують CLDN6, збагачені CSC-подібними клітинами, і додатково підтверджують, що CLDN6 є CSC маркером.

Приклад 6. Лікування розвинених людських ксенотрансплантатних пухлин комбінацією антитіл до CLDN6 і хіміотерапевтичних засобів синергійно інгібує ріст пухлинних клітин і збільшує виживання

Мишам Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} були перевиті лінії клітин рака людини. Після того як пухлини сформувалися, мишей-носіїв пухлин розділяли на групи й вводили їм CLDN6-специфічні моноклональні антитіла (IMAB027), хіміотерапевтичний засіб або їх комбінацію. Контрольній групі вводили буфер (розріджувач як контроль).

Зокрема, для дослідження лікування людських ES-2(CLDN6) ксенотрансплантатних пухлин, клітинну лінію карциноми яєчника людини ES-2, стабільно трансфіковану людським CLDN6, культивували в мінімальному підтримуючому середовищі (Life Technologies), яке містить розчин 1 x замісних амінокислот (Life Technologies), 700 мкг/мл G418 (Life Technologies) і 10 % FCS (Life Technologies) при 37°С у вологому інкубаторі зі вмістом 5 % CO₂. Самкам 6-тижневого Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} мишей підшкірно (у бік) інокулювали клітини 5 × 10⁶ ES-2(CLDN6) клітин в 200 мкл PBS. На 3 день після підшкірної інокуляції пухлини мишам вводили або фізрозчин (контроль), антитіло або хіміотерапевтичний засіб (у вигляді монотерапії) і комбінацію антитіло/цитостатичний засіб терапевтичним групам (n=12 на групу). 15 мг/кг паклітакселю або фізрозчину (контроль) вводили на 3, 10 і 17 день після трансплантації клітин. Підтримуюче лікування антитілом починали на 4 день і вводили 3 рази на тиждень 35 мг/кг IMAB027 або розріджувач (контроль) (IMAB027 буфер) у вигляді болюсних ін'єкцій (чергуючи i.v./i.p./i.p.). Пухлинну масу й стан здоров'я реєстрували два рази на тиждень. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму максимум 1400 мм³ або коли з'являлися виразки пухлин. Інгібування росту пухлини аналізували за допомогою критерію Краскела-Уолесса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна.

Для дослідження лікування розвинених людських NEC14 ксенотрансплантатних пухлин лінію пухлини статевих клітин яєчка людини NEC14 культивували згідно з інструкціями виробника в середовищі RPMI 1640 GlutamaxTM (Life Technologies), яке містить 10 % FCS (Life

Technologies) при 37°С у вологому інкубаторі зі вмістом 5 % CO₂. Самкам Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} мишей 8-тижневого віку підшкірно (у бік) інокулювали клітини 2 × 10⁷ NEC14 клітин в 200 мкл PBS. При вивченні лікування розвинених пухлин, пухлини виростили до об'єму 50-150 мм³, потім до початку лікування мишей ділили на групи – контроль, антитіло або цитостатичний засіб у вигляді монотерапії й антитіло/цитостатичний засіб у вигляді комбінованої терапії (n=19 на групу). Через 6 днів після перевивки клітин вводили лікарські засоби окремо або в комбінації або розріджувач (фізрозчин) як контроль, так, як описано далі: цисплатин 1 мг/кг болюсні і.р. ін'єкції на 6, 7, 8, 9 і 10 день; карбоплатин 30 мг/кг болюсні і.р. ін'єкції на 6, 13 і 20 день й підтримуюче лікування антитілами три рази на тиждень 35 мг/кг IMAB027 або контроль-розріджувач (IMAB027 буфер) болюсні ін'єкції (чергуючи і.в./і.р./і.р.). Масу пухлин реєстрували два рази на тиждень. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму максимум 1400 мм³ або коли з'являлися виразки пухлин. Інгібування росту пухлини аналізували за допомогою критерію Краскела-Уолесса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна.

У порівнянні з контрольною групою лікування людських ES-2(CLDN6) ксенотрансплантантих пухлин, які ектопічно експресують людський CLDN6, паклітакселем є неефективним і не демонструє протипухлинної активності. На противагу до цього, IMAB027 інгібує ріст пухлини й збільшує тривалість життя мишей. Лікування комбінацією IMAB027 і паклітакселю синергійним чином інгібує пухлинний ріст (Фігура 8).

Більше того, і цисплатин і IMAB027 як окремі засоби здатні значно зменшувати ріст пухлини у тварин з пухлиною NEC14. Однак після первинного інгібування росту пухлин ми спостерігали рецидивуючий ріст пухлини у більшості тварин. При використанні в комбінованій терапії цисплатин і IMAB027 діють синергійно і не тільки інгібують ріст пухлини, але викликають повну ремісію пухлини NEC14. Показники виживання найбільш вражаючим чином демонструють терапевтичну ефективність IMAB027 у комбінації із цисплатином. У порівнянні із застосуванням окремих засобів майже все миші, проліковані IMAB027 у комбінації із цисплатином, залишаються живими протягом 90 днів після трансплантації пухлини (Фігура 9).

При лікуванні мишей-носіїв пухлин з розвиненими NEC14 ксенотрансплантантами пухлинами, інші похідні платини, такі як карбоплатин, продемонстрували тільки досить помірну протипухлинну ефективність. Проте, комбінація карбоплатину з IMAB027 дає в результаті синергійні ефекти інгібування пухлин, беручи до уваги високоефективне інгібування росту пухлин й продовження терміну виживання (Фігура 10).

Таким чином, комбінація CLDN6-специфічного антитіла з хіміотерапевтичними засобами збільшує інгібування росту пухлин й збільшує тривалість життя мишей з перевитими клітинами пухлин людини. Комбінація антитіла з хіміотерапевтичними засобами викликає синергійну дію щодо інгібування росту пухлинних клітин і збільшення виживання.

Приклад 7. CLDN6 є маркером CSC

Приклад 7.1. CLDN6 має важливе значення для здатності утворювати сфери клітин рака яєчника

Іншим ефективним способом дослідження CSC-подібних властивостей пухлинних клітин є аналіз сфероутворення. За допомогою цього аналізу можна легко перевірити здатність клітин до вільного росту, характерної ознаки CSCs. Щоб проаналізувати, чи відіграє роль CLDN6 у вільному рості пухлинних клітин, ми вибрали клітини COV318, клітинної лінії раку яєчника, яка містить субпопуляцію CLDN6-позитивних клітин. COV318 клітини були відсортовані за експресією CLDN6, при цьому й CLDN6-позитивним і негативним клітинним популяціям була надана можливість утворювати сфери протягом 21 дня за умов, специфічних для стовбурових клітин. Аналіз сфероутворення показав, що CLDN6-позитивні COV318-клітини продемонстрували здатність утворювати сфери при культивуванні за специфічних для стовбурових клітин умов, у той час коли CLDN6-негативні клітини майже повністю загинули (Фігура 11A). Ці результати показують, що CLDN6-позитивна фракція є збагаченою популяцією стовбурових клітин, яка проявляє здатність до вільного росту.

Для того, щоб визначити здатність CLDN6-позитивних COV318 клітин проходити через численні цикли клітинного поділу, зберігаючи свій недиференційований стан, ми досліджували "здатність" сфер продукувати друге покоління сфер. З цією метою сфери першого покоління CLDN6-позитивних COV318 клітин (22 день після посіву) дисоціювали на окремі клітини, які були посіяні знову. Через 23 дні після повторного висівання ми могли ясно бачити, що формується друге покоління сфер, причому ці новоутворені сфери були морфологічно більш однорідними, ніж вихідні сфери першого покоління (Фігура 11B). Ці спостереження додатково підтвердили, що CLDN6-позитивна фракція COV318 клітин є фракцією стовбурових клітин цієї клітинної лінії.

Узяті разом, ці результати явно показують, що CLDN6 відіграє більшу роль у вільному рості

клітин рака яєчника, що є основною ознакою ракових стовбурових клітин.

Приклад 7.2. Збагачення CLDN6-позитивних COV318 клітин після обробки хіміотерапевтичними засобами *in vitro*

Клітинна лінія раку яєчника COV318 демонструє неоднорідну експресію CLDN6, причому CLDN6 експресує дуже маленька субпопуляція клітин (~ 0,3-0,5 %). Обробка COV318 клітин похідними платини *in vitro* дає в кожному випадку залишкову клітинну популяцію з високим відсотком (> 2 %) CLDN6-позитивних клітин (Фігура 12). Специфічне нагромадження CLDN6-позитивних клітин після лікування показує, що ці клітини можуть мати перевагу селективного виживання або росту протягом хіміотерапії. Резистентність до традиційної хіміотерапії є ознакою CSCs.

Приклад 7.3. Збагачення CLDN6-позитивних COV318 клітин *in vivo*

У більш ранніх дослідженнях ми виявили, що COV318 клітини, підшкірно введені в бік безтимусних "голих" мишей, є слабоексодеривативними. На противагу цьому, у мишей, які одержали COV318 клітини шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції, розвиваються злоякісні асцити й очеревинні пухлини в межах більше 100 днів. На противагу до батьківських COV318 клітин (Фігура 13A), більшість клітин, виділених з асцитів і пухлин, були CLDN6-позитивними (Фігура 13B, верхня панель). Клітини COV318 знову втратили експресію CLDN6 *in vitro* після того, як їх культивували за стандартних умов (Фігура 13B, нижня панель). Це означає, що CLDN6-позитивні клітини COV318 мають більшу здатність до утворення пухлин, демонструючи, що маленька CLDN6-позитивна субпопуляція містить CSCs.

Приклад 7.4. CLDN6 корелює з маркерами стовбурових клітин рака яєчника в зразках первинних пухлин

Наші попередні дослідження показали, що CLDN6 колокалізується з деякими CSC маркерами в клітинних лініях раку яєчника, далі постало питання, чи корелює експресія CLDN6 також з CSC маркерами в зразках первинних пухлин, отриманих від пацієнтів з раком яєчника.

Із цією метою експресія мРНК CLDN6 і обраних маркерів, описаних у літературі як специфічні маркери при раку яєчника (CTCF, LIN28B, CD24, GNL3, EpCAM, CD44, ABCG2, ALDH1A1, AMACR, ATXN1, BMI1, BMP4, CD34, CD117, Myd88, Nanog, Notch 1, Pou5F1, CD133, Snail, Sox 2), була проаналізована в 42 зразках раку яєчника людини за допомогою qRT-ПЛР. Наступний кореляційний аналіз CLDN6 із цими маркерами проводили з використанням коефіцієнта кореляції Спірмена. Діаграма розсіювання значимих кореляцій, а також короткий виклад усіх кореляцій показані на Фігурі 14.

Позитивна кореляція була виявлена для CLDN6 з CTCF, LIN28B, CD24, GNL3 і EPCAM, у той час як був встановлено, що CD44 негативно корелює з CLDN6 у досліджених зразках раку яєчника (Фігура 14A). У відношенні всіх інших досліджених маркерів не було виявлено значимої кореляції (Фігура 14B).

Ці результати додатково підтверджують, що CLDN6 є CSC маркером.

Приклад 8. Протипухлинна активність анти-CLDN6 антитіл збільшується при використанні комбінації з хіміотерапевтичними засобами

Приклад 8.1. Вплив хіміотерапевтичних засобів на опосередковану IMAB027 ADCC

Вплив хіміотерапевтичних засобів на IMAB027-опосередковану ADCC був проаналізований з використанням клітин COV362(Luc), які були попередньо оброблені карбоплатином, гемцитабіном, паклітакселем, доксорубіцином і топотеканом, відповідно. Попередня обробка клітин призводить до підвищення рівнів CLDN6 на поверхні клітин, що продемонстровано за допомогою проточної цитометрії (Фігура 15B, D, F, H і J). У порівнянні з необробленими клітинами максимальний лізис клітин, оброблених хіміотерапевтичними засобами, підвищується до 3 разів (Фігура 15A, C, E, G і I). Отже, протипухлинна активність IMAB027 може підвищуватися при використанні в комбінації з хіміотерапевтичними засобами.

Приклад 8.2. Комбінація мультихіміотерапії РЕВ (цисплатин, етопозид і блеоміцин) з IMAB027 з високою ефективністю збільшує інгібування росту пухлин і збільшує виживання мишей із трансплантованою людською пухлинною лінією клітин NEC14

Мишам Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} були підшкірно трансплантовані клітини пухлини статевих клітин яєчка людини – лінія клітин NEC14. Мишей із запущеними пухлинами розділяли на групи випадковим чином і лікували антитілом IMAB027, мультихіміотерапією РЕВ (цисплатин, етопозид і блеоміцин) або комбінацією IMAB027 і РЕВ.

У порівнянні з мишами, яких не лікували або лікували IMAB027, у мишей, які одержували мультихіміотерапію, ріст пухлини зменшувався досить значно (Фігура 16A). Однак, після первинної відповіді на РЕВ-лікування, пухлини в більшості тварин починали рости на 30 день. Тривале інгібування росту пухлин відзначалося тільки при використанні комбінованого підходу, при якому РЕВ і IMAB027 разом діють синергічно (Фігура 16B). Медіана виживання в

нелікованих мишей становила 30 днів, тоді як медіани виживання в мишей, яких лікували IMAB027 і РЕВ, становили 34 і 97 днів, відповідно. У групі, яку лікували РЕВ, 3/14 (21 %) у мишей спостерігалася повна ремісія пухлин, а в 1/14 (7 %) мишей була залишкова пухлина ~30 мм³ наприкінці дослідження. Несподівано було виявлено, що повна регресія пухлин спостерігалася в 12/14 (86 %) мишей, яких лікували РЕВ у комбінації з IMAB027. 11 мишей було виліковано без ознак рецидиву протягом 6 місяців, і одну мишу, яка не мала пухлини, піддали евтаназії на 93 день внаслідок поганого загального стану здоров'я (Фігура 16С). Дослідження показало, що у тварин із запущеними людськими пухлинами яєчка NEC14, що одержували РЕВ у комбінації з IMAB027, спостерігалася істотне збільшення виживання й показника відповідної реакції в порівнянні із тваринами, яких лікували мультитерапією окремо.

Приклад 9. Кон'югати анти-CLDN6-антитіл з лікарськими засобами є високоефективними при лікуванні пухлин, які експресують CLDN6

Приклад 9.1. Зв'язування й протипухлинна активність токсину, кон'югованого з IMAB027, *in vitro*

Відносні афінності зв'язування кон'югатів IMAB 027- лікарський засіб IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE були вивчені на клітинній лінії раку яєчника OV90 за допомогою проточної цитометрії. В експерименті із насичення зв'язування концентрацію антитіл наносили на графік залежно від середньої величини інтенсивності флуоресценції (MFI) і значення EC₅₀ (концентрація антитіл, які зв'язуються з половиною місць зв'язування у стані рівноваги), причому максимальне зв'язування було обчислено за допомогою нелінійної регресії. У порівнянні з некон'югованим IMAB027, обидва кон'югата IMAB027- лікарський засіб демонстрували подібні низькі значення EC₅₀, при цьому насичення зв'язування було досягнуто при низьких концентраціях (Фігура 17А). Цитотоксичну активність кон'югатів IMAB027- лікарський засіб визначали за допомогою OV90 клітин з використанням ХТТ-аналізу проліферації. Крива залежності від дози показує подібне інгібування росту пухлинних клітин для IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE *in vitro* (Фігура 17В). Отже, IMAB027, кон'юговане з DM1 або vcMMAE, зв'язується з подібною відносною афінністю з CLDN6-позитивними клітинами-мішенями, що призводить до ефективного знищення пухлинних клітин.

Приклад 9.2. Лікування прогресуючих людських ксенотрансплантатних пухлин кон'югованим з токсином антитілом до CLDN6 IMAB027 інгібує ріст пухлинних клітин, збільшує виживання і опосередковує повну регресію пухлини

Протипухлинна активність CLDN6-специфічного антитіла IMAB027, кон'югованого із цитотоксичним лікарським засобом, була протестована на мишах, яким були трансплантовані CLDN6-позитивні клітини ліній карциноми людини. У цьому таргентному методі IMAB027 приєднали до майтансинаїду DM1 або ауристатину Е (MMAE) і контролювали ріст пухлини в безтимусних nude-Foxn1^{nu} мишей з розвиненими ксенотрансплантатними пухлинами.

Лікування з використанням моделі розвинутої ксенотрансплантатної підшкірної OV90 пухлини яєчника людини:

Протипухлинний ефект IMAB027, кон'югованого з токсином, досліджували на мишах з розвиненими людськими ксенотрансплантатними пухлинами з гомогенною експресією CLDN6. Лікування починали на 10 день після трансплантації пухлинних клітин. Після одноразової *i.v.* болюсної ін'єкції IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE значимо інгібували пухлинний ріст ксенотрансплантатів OV90 карциноми яєчника, які гомогенно експресують CLDN6 (Фігури 18 і 19А). Більше того, одноразове застосування 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE приводило до повної ремісії пухлин в 60 % пролікованих мишей (Фігура 19В).

Лікування з використанням моделі прогресуючої людської підшкірної ксенотрансплантатної пухлини яєчника PA-1

Протипухлинний ефект кон'югованого з токсином IMAB027 досліджували також на моделі прогресуючої ксенотрансплантатної пухлини з гетерогенною експресією CLDN6. Через деякий проміжок часу після підшкірної трансплантації ксенотрансплантатні пухлини PA-1 втрачають експресію CLDN6 (Фігура 20С). Лікування починали на 15 день. У цей час ксенотрансплантатні пухлини PA-1 починають втрачати експресію CLDN6. Тварини одержували 4, 8 або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE шляхом одноразової *i.v.* болюсної ін'єкції. Контрольним тваринам вводили некон'юговане IMAB027 або розріджувач (буфер).

Лікування IMAB027-vcMMAE з високою значимістю інгібувало ріст ксенотрансплантатів PA-1 пухлини й збільшувало виживання мишей-носіїв пухлин, у той час як IMAB027 або IMAB027-DM1 (дані не показані) не впливають на пухлинний ріст PA-1 (Фігура 20А і В).

Знижений рівень CLDN6-позитивних пухлинних клітин в пухлинній масі очевидно обумовлює слабку протипухлинну активність IMAB027 і IMAB027-DM1 в цій пухлинній моделі *in vivo*. IMAB027-DM1 з'єднується за допомогою нерозщеплюваного лінкера з токсином DM1,

нездатним проникати крізь мембрану. На противагу до цього, IMAB027-vcMMAE з'єднується з MMAE-токсиком, який проникає крізь мембрану, за допомогою лінкера, розщеплюваного катепсином. Вивільнення проникаючих крізь мембрану форм MMAE після процесингу в клітині сприяє знищенню пухлинних клітин, позбавлених певного епітопу (ефект "свідка"). Отже, лікування за допомогою IMAB027-vcMMAE є високоефективним для усунення PA-1 пухлин, що мають як CLDN6-позитивні, так і CLDN6-негативні клітини.

Отже, IMAB027-vcMMAE є високоефективним при знищенні людських ксенотрансплантатних пухлин з гетерогенною експресією CLDN6 за рахунок таргентного активованого клітинами знищення клітин "свідків".

Лікування з використанням моделі прогресуючої людської підшкірної ксенотрансплантатної пухлини MKN74 шлунка

На противагу до ксенотрансплантатних PA-1 пухлин, які втрачають експресію CLDN6 у розвинених пухлинах, MKN74 ксенотрансплантатні пухлини збільшують експресію CLDN6. Як показано за допомогою проточної цитометрії з використанням CLDN6-специфічного антитіла IMAB027 <0,3 % клітин лінії рака шлунка MKN74 є CLDN6-позитивними *in vitro*. Цікаво, що значна кількість пухлинних клітин демонструють експресію CLDN6 після підшкірної трансплантації безтимусним голим мишам (Фігура 21C). Лікування розвинених MKN74 ксенотрансплантатних пухлин 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE давало в результаті значиме інгібування росту пухлин й збільшення виживання (Фігура 21A і B).

Інгібування росту пухлини, яке спостерігається при використанні IMAB027-vcMMAE, може бути викликане таргентним активованим клітинами знищенням клітин "свідків".

Лікування з використанням моделі прогресуючої людської внутрішньоочеревинної ксенотрансплантатної пухлини яєчника PA-1

На додачу до лікування підшкірних (s.c.) ксенотрансплантатних пухлин протипухлинна активність кон'югованих з токсином IMAB027 антитіл також була досліджена на ксенотрансплантатній внутрішньоочеревинній (i.p.) пухлинній моделі з використанням PA-1 клітин, які ектопічно експресують люциферазу, з метою *in vivo* моніторингу (Фігура 22). Миші одержували 16 мг/кг IMAB027-DM1 або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE за допомогою одноразової *i.v.* болусної ін'єкції на 14 день після приживлення пухлинних клітин.

Вимірювання інтенсивності біоломінесценції *in vivo* показало інгібування росту пухлин очеревинних PA-1 метастазів після лікування IMAB027-DM1. Крім того, IMAB027-vcMMAE значимо продемонструвало більш високий протипухлинний ефект, ніж IMAB027-DM1 або розріджувач, при повній регресії очеревинних пухлин в 100 % тварин (Фігура 22).

Отже, IMAB027-vcMMAE і IMAB027-DM1 є високоефективними й не демонструє токсичних побічних ефектів *in vivo* у перевіреному діапазоні концентрацій. IMAB027-DM1 значно інгібував ріст підшкірних ксенотрансплантатних пухлин і зменшував ріст перитонеальних ксенотрансплантатних пухлин. IMAB027-vcMMAE високоефективно інгібував ріст пухлин й збільшував виживання тварин з підшкірними або перитонеальними ксенотрансплантатними пухлинами людини з гомогенною або навіть гетерогенною експресією CLDN6. Самим вражаючим є те, що більша частина тварин-носіїв пухлин була вилікована після застосування MMAE-кон'югованих антитіл. Помітна протипухлинна активність IMAB027-vcMMAE, зокрема, яка спостерігалась у тварин-носіїв пухлин з гетерогенною експресією CLDN6, показала, що кон'югати IMAB027-vcMMAE придатні для лікування пухлин з низьким відсотком CLDN6-позитивних клітин.

Приклад 9.3. Ендоцитоз CLDN6-специфічних антитіл залежить від їх афінності й епітопа зв'язування CLDN6

Цитотоксична ефективність антитіл, кон'югованих з токсином, явно залежить від опосередкованої мішенню можливості їх інтерналізації. Таким чином, одержання антитіл з високими рівнями ендоцитоза є основним ключовим фактором при розробці антитіл, кон'югованих з токсином.

Ефективність ендоцитоза була протестована *in vitro* шляхом інкубації клітин карциноми людини, які ендегенно експресують CLDN6, разом з CLDN6-активними моноклональними химерними антитілами й антилюдина Fab-фрагментами, кон'югованими з токсином сапоніном. Інтерналізація комплексів CLDN6-зв'язане антитіло/Fab-сапонін приводить до специфічного знищення клітин і може вимірюватися з використанням аналізу життєздатності клітин. Скринінг різних CLDN6-активних антитіл показує, що ендоцитоз залежить не тільки від афінності зв'язування антитіла, але також від епітопа. Ми виявили, що зв'язування CLDN6-специфічних антитіл з епітопом у першій позаклітинній петлі CLDN6 сприяє ендоцитозу в клітинах карциноми людини OV-90 і PA-1. Показово, що CLDN6-реактивне антитіло 5F2D2, яке зв'язується з подібною або більш високою афінністю, але з іншим епітопом, демонструє більш низький

цитотоксичний потенціал у цьому дослідженні (Фігура 23).

Приклад 10. Матеріали й методи, використані в наведених вище прикладах 7-9

Культура клітин

Клітини COV362(Luc) і PA-1(Luc), які стабільно експресують люмінесцентний ген-репортер, були отримані шляхом стабільної трансфекції клітинних ліній COV362 (ECACC, 07071910) і PA-1 (ATCC, CRL-1572) люциферазою світлячка, відповідно.

Клітини NEC14 (JCRB, 0162) і MKN74 (JCRB, 0255) культивували в середовищі RPMI1640 (Gibco, 61870-010) з додаванням 10 % інактивованої нагріванням FCS (Gibco, 10270-106). Клітини COV318 (ECACC, 07071903) і COV362(Luc) культивували в середовищі DMEM (Gibco, 41965-039), яке містить 2 мМ Glutamax (Gibco, 35050-038) і 10 % інактивованої нагріванням FCS. Клітини PA-1 і PA-1(Luc) культивували в середовищі MEM (Gibco, 31095-029) з додаванням 1,5 г/л бікарбонату натрію (Invitrogen, 25080), 1 мМ пірувату натрію (Invitrogen, 11360), 1 % замінних амінокислот (Gibco, 11140-035) і 10 % інактивованої нагріванням FCS. Клітини OV90 (ATCC, CRL-11732) культивували в суміші 1:1 MCB105 (Sigma, M6395) і середовища 199 (Sigma, M4530) з додаванням 1,5 г/л бікарбонату натрію й 15 % інактивованої нагріванням FCS. Клітини росли при 37 °C і 5 % CO₂.

Визначення експресії CLDN6 за допомогою проточної цитометрії:

Клітини збирали за допомогою 0,05 % трипсин/EDTA (Gibco, 25300-054), промивали FACS-буфером (PBS, що містить 2 % FCS (Gibco, 10270-106) і 0,1 % азиду натрію (Applichem, A1430)) і ресуспендували в FACS-буфері з концентрацією 2×10^6 клітин/мл. 100 мкл клітинної суспензії інкубували з анти-CLDN6-антитілом IMAB027 або ізотиповим контрольним антитілом до людського IgG1 (Sigma, I5154) при концентрації 2,5 мкг/мл протягом 30 хвилин при 4 °C. Клітини три рази промивали FACS-буфером і інкубували з APC-кон'югованим F(ab')₂ фрагментом козячого антилюдина IgG (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170), розведеним 1:200 в FACS-буфері протягом 30 хвилин при 4 °C. Клітини два рази промивали й ресуспендували в FACS-буфері. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії, використовуючи BD Facsarray (BD Biosciences) і комп'ютерне програмне забезпечення Flowjo (Tree Star Inc.). Для виключення з аналізу мертвих клітин використовували барвник пропідіум йодид (Sigma, P4864).

Обробка COV318 клітин платиновими похідними

Клітини COV318 ($1,2 \times 10^6$ клітин на 100 мм культуральну чашку) вирощували за стандартних умов. Через 24 години клітини обробили 0,5 мкг/мл цисплатину або 2 мкг/мл карбоплатину й інкубували протягом 96 годин. Середовище замінили, і оброблені клітини вирощували за стандартних умов росту. Через 3 і 6 днів клітини аналізували на експресію CLDN6 за допомогою проточної цитометрії.

Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність (ADCC) після обробки цитостатичними речовинами

Лінія клітин карциноми яєчника людини COV362, стабільно трансфікована люциферазою як репортером, була використана для визначення впливу карбоплатину й паклітакселю на IMAB027-опосередковану ADCC.

Клітини COV362(Luc) (3×10^6 клітин на 150 мм культуральну чашку) вирощували за стандартних умов. Через 24 години клітини обробили 5 нг/мл паклітакселю, 20 мкг/мл карбоплатину, 25 нг/мл гемцитабіну, 20 нг/мл доксорубіцину або 7,5 нг/мл топотекану й інкубували протягом 4 днів. Середовище замінили, а оброблені клітини вирощували за стандартних умов росту протягом 3 додаткових днів (при використанні карбоплатину й гемцитабіну) або 10 днів (при використанні паклітакселю, доксорубіцину або топотекану).

Клітини збирали за допомогою 0,05 % трипсину/EDTA (Gibco, 25300-054) і регулювали концентрацію до 2×10^5 клітин/мл в DMEM, що містить 2 мМ глутаміну (Gibco, 25030-081) і 20 мМ HEPES (Gibco, 15630-056). 1×10^4 клітин на комірку висівали в прозорий 96-комірковий PP-планшет і інкубували протягом ~5 годин при 37 °C і 5 % CO₂.

РВМС (мононуклеарні клітини периферичної крові) виділяли зі зразків людської донорської крові центрифугуванням у градієнті щільності з використанням фікол-гіпак (GE Healthcare, 17144003). Були виділені РВМС, що містять інтерфазу, клітини два рази промивали PBS, що містить 2 мМ EDTA. РВМС ресуспендували в X-Vivo 15 середовищі (Lonza, BE04-418Q) з концентрацією $1,6 \times 10^7$ клітин/мл і зберігали при 37 °C і 5 % CO₂ до проведення дослідження.

25 мкл IMAB027 і ізотипових контрольних антитіл додали до клітин у зазначених концентраціях. Після цього додали 25 мкл суспензії РВМС і інкубували клітини протягом 24 годин при 37 °C і 5 % CO₂.

Після додавання 10 мкл 8 % Тритон X-100 (Sigma, T8787) в PBS до контролів "загальний лізис", 10 мкл PBS до контролів "макс. життєздатні клітини" і до зразків, додали 50 мкл люциферинової суміші (3,84 мг/мл D-люциферин (Sigma Aldrich, 50227) і 160 мМ HEPES в

ddH₂O) і інкубували клітини в темряві за кімнатної температури протягом 90 хвилин. Біоломінесценцію вимірювали за допомогою люмінометра (Infinite M200, TECAN). Результати подані у вигляді інтегрованих числових відносних світлових одиниць (RLU).

Специфічний лізис обчислювали в такий спосіб:

5 Специфічний лізис [%]=100 - [(зразок - загальний лізис)/(максимум життєздатних клітин - загальний лізис)×100]

максимум життєздатних клітин: 10 мкл PBS, без антитіл

загальний лізис: 10 мкл 8 % (об./об.) Тритон X-100 в PBS, без антитіл

Внутрішньоочеревинне приживлення COV318 клітин у безтимусних "голих" мишей

10 На мишах *in vivo* була досліджена канцерогенність лінії клітин карциноми яєчника людини COV318 і нагромадження CLDN6-позитивних клітин. Відповідно, 2×10⁷ COV318 клітин, ресуспендованих в PBS, вводили внутрішньоочеревинно самкам мишей 8-тижневого віку Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}. Здійснювався щоденний контроль над мишами. Як тільки небезпечні для життя симптоми ставали очевидними, тварину піддавали евтаназії. Виділяли пухлинні й асцитні клітини й культивували їх для додаткового аналізу.

15 Пухлини механічно дисоціювали, пропускали крізь сито й промивали середовищем DMEM (Gibco, 41965-039). Для одержання одноклітинної суспензії пухлинні клітини обробляли акутазою (Life Technologies, A11105-01) протягом 30 хвилин при 37 °C, пропускали крізь сито із вічком 40 мкм і промивали середовищем DMEM. Асцити збирали, забруднення із еритроцитів видаляли за допомогою ACK (амоній-хлорид-калій) лізуючого буфера (Invitrogen, A10492-01). Пухлину й асцитні клітини вирощували за стандартних умов з використанням стандартного середовища COV318 з додаванням пеніциліну/стрептоміцину (Gibco, 15140). Скринінг клітин відносно експресії CLDN6 проводили за допомогою проточної цитометрії.

Лікування запущених людських ксенотрансплантантних NEC14 пухлин

25 Самкам мишей 8-тижневого віку Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} підшкірно в бік інокулювали 2×10⁷ NEC14 клітин в 200 мкл PBS. При дослідженні лікування запущених пухлин, пухлини росли протягом 13 днів до максимального об'єму 170 мм³, потім мишей розділили на групи контроль, IMAB027, РЕВ (цисплатин, етопозид, блеоміцин) і IMAB027/РЕВ (n=14 на групу) до лікування.

Через 13 днів після перевивання клітин вводили лікарські засоби, як описано далі: 1 мг/кг болюсні і.р. ін'єкції цисплатину в 13, 14, 15, 16 і 17 день; 5 мг/кг болюсні і.р. ін'єкції етопозиду в 13, 14, 15, 16 і 17 день; 10 мг/кг болюсні і.р. ін'єкції блеоміцину в 13, 17 і 21 день. IMAB027 застосовували три рази на тиждень від 13 до 101 дня за допомогою почергових і.в./і.р./і.р. болюсних ін'єкцій 35 мг/кг IMAB027. Як розріджувач-контроль мишам вводили буфер для лікарської субстанції замість антитіла або 0,9 % NaCl розчин замість РЕВ, відповідно.

35 Масу пухлини й стан здоров'я тварин контролювали два рази на тиждень. Мишей забивали, коли пухлина досягала об'єму 1400 мм³ або коли на пухлині з'являлися виразки. Інгібування росту пухлин аналізували за допомогою критерію Крускала-Уоллеса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна.

Аналіз сфероутворення

40 Для проведення аналізу сфероутворення клітини COV318 фарбували на CLDN6 за допомогою 0,5 мкг/мл IMAB027 протягом 30 хвилин при 4 °C з наступною інкубацією з козячими вторинними антитілами до IgG людини (1:300) протягом 10 хвилин при 4 °C і клітини після цього сортували відносно експресії CLDN6 з використанням клітинного сортера BD FACSAria. Потім 1×10⁶ CLDN6-позитивних або CLDN6-негативних відсортованих клітин висівали в комірки 6-коміркових планшетів з наднизьким прикріпленням Ultra Low Attachment Plate (Corning) у безсироваточному середовищі DMEM/F12, яке містить 0,4 % бичачого сироваткового альбуміну, 20 нг/мл основного фактора росту фібробластів, 10 нг/мл епідермального фактора росту й 5 мкг/мл інсуліну й давали можливість клітинам утворювати сфери протягом 21 дня за цих специфічних для стовбурових клітин умов. Середовище міняли кожний другий день, не руйнуючи сфери, і регулярно робили характерні знімки.

Для одержання другого покоління сфер перше покоління сфер CLDN6-позитивних COV318 клітин (22 день після висівання) дисоціювали до окремих клітин і потім повторно висівали в комірки 6-коміркових планшетів Ultra Low Attachment Plates. І знову, середовище міняли кожний другий день, не руйнуючи сфери, і регулярно робили характерні знімки.

55 Кількісний аналіз ПЛР у реальному часі з використанням системи Bio Mark™ HD (Fluidigm)

42 зразка раку яєчника людини досліджували за допомогою qRT-ПЛР із використанням суміші для визначення рівня експресії генів Taqman® gene expression assays (Life technologies) у відношенні обраних специфічних факторів стовбурових клітин рака яєчника (CTCFL, LIN28B, CD24, GNL3, EpCAM, CD44, ABCG2, ALDH1A1, AMACR, ATXN1, BMI1, BMP4, CD34, CD117, Myd88, Nanog, Notch 1, Pou5F1, CD133, Snail, Sox 2) з використанням системи Bio Mark™ HD

(Fluidigm). Виділення РНК зі зразків раку яєчника проводили за допомогою набору Rneasy Mini Kit (Qiagen), а кДНК синтезували з використанням набору реагентів Primescript RT Reagent Kit (Takara Bio Inc.) згідно з відповідними інструкціями виробника. Зразки готували й аналізували відповідно до протоколу Fluidigm® Advanced Development Protocol 28-Fast Gene Expression Analysis з використанням Taqman® GE Assays rev A2. Завантаження в 96,96 Gene Expression Dynamic Array Ілс здійснювалася за допомогою ІFC Controller HX. Набори чипів аналізували за допомогою системи Fluidigm Biomark™ HD. Taqman Preamplifier Mastermix купували від компанії Applied Biosystems. Набір даних оцінювали згідно з методом $\Delta\Delta C_t$. Кореляційний аналіз CLDN6 з обраними маркерами стовбурових клітин рака яєчника проводили з використанням коефіцієнта кореляції Спірмена. Значимість кореляційних значень оцінювали за допомогою тесту на коефіцієнти кореляції. Р-значення були скореговані відносно багаторазового тестування з використанням методу Benjamini і Hochberg, і скоректовані р-значення $\leq 0,05$ вважалися значимими.

Кон'югування CLDN6-антитіл з токсином

Кон'югування з токсином моноклональних антитіл здійснювали при Piramal Healthcare (Grangemouth, UK).

Для кон'югації з DM1 "голі" антитіла модифікували за допомогою вступання в реакцію SMCC (6× молярність) з вільними NH_2 залишками лізинових груп шляхом інкубації в PBS (pH 7,2) протягом 1 години за RT. Потім був проведений діаліз модифікованих антитіл в 35 мМ цитратному буфері (pH 5,0), відношення лінкера до антитіла визначали за допомогою зворотного аналізу Елмана. DM1 (6× молярність) кон'югував через його сульфгідрильну групу із фрагментом малеїмиду SMCC лінкера при інкубації протягом 17 годин за RT. Був проведений діаліз кон'югованих антитіл у буферній суміші (20 мМ His, 85 мг/мл сахароза, pH 5,8) і зберігали при -80°C . Співвідношення лікарського засобу й антитіла аналізували за допомогою УФ-спектрометрії, вміст мономера - за допомогою ексклюзивної ВЕРХ і вміст вільного лікарського засобу - за допомогою обернено-фазової ВЕРХ.

Для кон'югації з MMAE "голі" антитіла діалізували в PBS (pH 7,2) і модифікували тіолованням вільних NH_2 -груп залишків лізину з використанням реагенту Троту (2-імінотіолат) (20 × молярність) протягом 2 годин при RT. Потім тіювання антитіла діалізували в 35 мМ цитратному буфері (pH 5,5) і співвідношення лінкера до антитіла визначали, використовуючи зворотний аналіз Елмана. vcMMAE (6 × молярність) було кон'юговано через валін лінкера, який розщеплюється катепсином, із сульфгідрильною групою тіюваних антитіл шляхом інкубації протягом 15 годин при RT. Кон'юговані антитіла діалізували в буферній суміші (20 мМ His, 85 мг/мл сахарози, pH 5,8) і зберігали при -80°C . Співвідношення лікарського засобу й антитіла аналізували за допомогою УФ-спектрометрії, вміст мономера - за допомогою ексклюзивної ВЕРХ і вміст вільного лікарського засобу - за допомогою обернено-фазової ВЕРХ.

Визначення відносної афінності зв'язування за допомогою проточної цитометрії

Клітини збирали за допомогою 0,05 % трипсину/EDTA (Gibco, 25300-054), промивали FACS буфером (PBS, який містить 2 % FCS (Gibco, 10270-106) і 0,1 % азид натрію (Applichem, A1430)) і ресуспендували в FACS буфері при концентрації 2×10^6 клітин/мл. 100 мкл клітинної суспензії інкубували протягом 30 хвилин при 4°C з IMAB027, IMAB027-DM1 або IMAB027-vcMMAE (серії титрування від 0,1 нг/мл до 20 мкг/мл). Потім клітини три рази промивали FACS буфером і інкубували протягом 30 хвилин при 4°C з антилюдським IgG (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170) розведеним в 1:200 в FACS буфері. Після цього клітини два рази промивали й ресуспендували в 100 мкл FACS буфера. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії з використанням BD Facsarray (BD Biosciences) і програмного забезпечення FlowJo (Tree Star Inc.).

Оцінка життєздатності при використанні IMAB027, кон'югованого з токсином

Вплив IMAB027-DM1 і IMAB027-vcMMAE на життєздатність клітинних ліній рака людини визначали *in vitro* з використанням колориметричного аналізу, який проявляє метаболічну активність клітин (Cell Proliferation Kit XTT from Applichem).

Клітини OV90 збирали за допомогою 0,05 % трипсину/EDTA (Gibco, 25300-054), потім 2500 клітин висівали в 50 мкл ростового середовища в 96-комірковий планшет. Через 24 години додавали серії концентрацій DM1- і MMAE-кон'югованих IMAB027 або ізотипових контрольних антитіл, розведених в 50 мкл середовища. Клітини культивували протягом 3-7 днів доти, поки необроблені клітини не досягали $\sim 80\%$ злиття. Життєздатність клітин аналізували з використанням набору Applichem Cell Proliferation Kit II (Applichem, A8088-1000) згідно з інструкціями виробника. Через 3-5 годин інкубації з ХТТ реагентом 100 мкл клітинних супернатантів переносили в новий 96-комірковий аналітичний планшет і вимірювали поглинання при 480 нм (стандарт 630 нм) з використанням спектрофотометра (Tecan).

Життєздатність була обчислена з використанням наступного рівняння:

$$\text{reduction of viability}[\%] = 100 - \left[\frac{(\text{sample} - \text{blank})}{(\text{max. viable cells} - \text{blank})} * 100 \right]$$

5 зменшення життєздатності $[\%] = 100 - [(\text{зразок} - \text{бланк}) : (\text{максим. життєздатність клітин} - \text{бланк}) * 100]$

бланк (порожня проба): середовище й ХТТ без клітин

максим. життєздатність клітин: клітини, середовище й ХТТ

10 Значення EC_{50} визначали за допомогою програмного забезпечення Graphpad Prism 6 за допомогою нелінійної регресії.

Лікування розвинених підшкірних OV90 ксенотрансплантатних пухлин

15 Клітини лінії карциноми яєчника людини OV90 культивували за стандартних умов. Для перевивання самкам мишей 8-тижневого віку Hsd:ATHymic Nude-Foxn1^{nu} підшкірно інокулювали в бік 1×10^7 OV90 клітин в 200 мкл PBS. У дослідженні з використанням запущених пухлин пухлини росли протягом 10 днів, потім мишей з розвиненими пухлинами об'ємом 50-150 мм³ випадковим чином розділили на групи з розчинником і антитілом (n=10) до лікування. Об'єм пухлини (TV = (довжина × ширина²)/2) контролювали два рази на тиждень. TV виражали в мм³, що дозволяло побудувати криві росту пухлин протягом часу.

20 У дослідженні з визначення початкової дози тваринам одноразово i.v. вводили розріджувач, IMAB027-DM1 (1,78 мг/кг, 5,33 мг/кг або 16 мг/кг), а на 35 день після трансплантації препарували. У дослідженні з визначення другої дози тваринам вводили один раз i.v. розріджувач, IMAB027-vcMMAE (4 мг/кг, 8 мг/кг або 16 мг/кг) або IMAB027-DM1 (1,33 мг/кг, 2,67 мг/кг або 5,33 мг/кг). IMAB027 застосовували три рази на тиждень за допомогою почергових i.v./i.p./i.p. болюсних ін'єкцій 35 мг/кг IMAB027. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму 25 більше, чим 1400 мм³ або коли на пухлині з'являлися виразки. Інгібування росту пухлин аналізували за допомогою критерію Крускала-Уоллеса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна. Виживання аналізували за допомогою критерію Коксу-Мантеля.

Лікування розвинених підшкірних PA-1 ксенотрансплантатних пухлин та імуногістохімічне дослідження зрізів пухлин

30 Клітинну лінію карциноми яєчника людини PA-1 культивували за стандартних умов. Для перевивання самкам мишей 8-тижневого віку Hsd:ATHymic Nude-Foxn1^{nu} у бік підшкірно інокулювали 1×10^7 PA-1 клітин в 200 мкл PBS. У дослідженні на розвинених пухлинах, пухлини вирощували протягом 15 днів, і мишей з розвиненими пухлинами об'ємом 40-120 мм³ випадковим чином розділяли на групи з розріджувачем і антитілом (n=10) до лікування. Об'єм 35 пухлини (TV = (довжина × ширина²)/2) контролювали два рази на тиждень. TV виражали в мм³, що дозволяло побудувати криві росту пухлин у часі.

40 Тваринам i.v. вводили одноразово розріджувач, IMAB027-vcMMAE (4 мг/кг, 8 мг/кг або 16 мг/кг) або IMAB027-DM1 (4 мг/кг, 8 мг/кг або 16 мг/кг). IMAB027 застосовували три рази на тиждень за допомогою почергових болюсних i.v./i.p./i.p. ін'єкцій 35 мг/кг IMAB027. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму більше, ніж 1400 мм³, або на пухлині з'являлися виразки. Інгібування росту пухлин аналізували за допомогою критерію Крускала-Уоллеса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна. Виживання аналізували за допомогою критерію Коксу-Мантеля.

45 Щоб проаналізувати експресію CLDN6 під час закладки й розвитку PA-1 пухлин, пухлини нелікованих мишей розтинали на 7, 14 і 56 день, відповідно, фіксували у формаліні й заливали в парафін. Робили зрізи тканин 4 мкм від кожного FFPE (зафіксованого у формаліні й залитого парафіном) блоку, поміщали на адгезивні слайди (Superfrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific) і висушували протягом 60 хвилин при 60 °C. До фарбування FFPE зрізи тканин депарафінували. Зрізи кип'ятили в 10 mM лимонній кислоті з додаванням 0,05 % твіну-20 (pH 6,0) при 120 °C 50 протягом 10 хвилин. Ендогенні пероксидази гасили за допомогою інкубації в 0,3 % H₂O₂ в PBS протягом 15 хвилин. Після промивання PBS сайти неспецифічного зв'язування антитіл блокували протягом 30 хв. блокувальним буфером (10 % козячої сироватки в PBS) при RT, з наступною інкубацією протягом ночі з 0,2 мкг/мл первинних кролячих антиклаудин-6 антитіл (IBL-America, 18865), розведених у блокувальному буфері. Потім зразки промивали 3 рази PBS і 55 інкубували з відповідними вторинними готовими до використання антитілами (Power Vision HRP козячі антикролик; Immunologic) протягом 30 хвилин при RT. Візуалізацію проводили протягом 4:30 хвилин з використанням розчину субстрат-хромоген (Vectorred; Vector Laboratories). Після дофарбовування гематоксиліном, дегідратації й приготування препаратів, зрізи аналізували за допомогою мікроскопа Leica DM2000.

Лікування запущених підшкірних MKN74 ксенотрансплантантих пухлин і імуногістохімічний аналіз зрізів пухлин

Клітинні лінії карциноми шлунка людини MKN74 культивували за стандартних умов. Для перевивання самкам мишей 8-тижневого віку Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} у бік підшкірно інокулювали 1×10^7 MKN74 клітин в 200 мкл PBS. Для дослідження лікування запущених пухлин пухлини росли протягом 7 днів, потім мишей з розвиненими пухлинами об'ємом 200 ± 30 мм³ випадковим чином ділили на групи з розріджувачем і антитілом (n=10) до лікування. Об'єм пухлини ($TV = (\text{довжина} \times \text{ширина}^2)/2$) контролювали два рази на тиждень. TV виражали в мм³, що дозволяло побудувати криві росту пухлин у часі.

Тварини одержували розріджувач (буфер) як контроль або 16 мг/кг IMAB027-vcMMAE на 8 день за допомогою одноразової болюсної i.v. ін'єкції. Мишей забивали, коли пухлини досягали об'єму більше, ніж 1400мм³, або на пухлині з'являлися виразки. Інгібування росту пухлин аналізували за допомогою критерію Крускала-Уоллеса й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна. Вживання аналізували за допомогою критерію Манна-Уїтні й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна. Вживання аналізували за допомогою критерію Коксу-Мантеля.

Інгібування росту пухлин аналізували за допомогою критерію Манна-Уїтні й апостеріорного критерію множинного порівняння Данна. Вживання аналізували за допомогою критерію Коксу-Мантеля.

Експресію CLDN6 на клітинах MKN74 аналізували за допомогою проточної цитометрії перед приживленням і за допомогою гістохімії на необроблених MKN74 ксенотрансплантатах, розтин яких проводили на 31 день.

Для проведення імуногістохімічного аналізу готували зрізи тканин товщиною 3 мкм, поміщали на слайди й висушували на повітрі протягом 90 хвилин при RT. Усі зрізи тканин фіксували протягом 10 хвилин в ацетоні при -20 °C і промивали протягом 5 хвилин в PBS. Ендогенні пероксидази гасили за допомогою інкубації з 0,03 % перекисом водню (Dakocytomation Envision System, K4011) протягом 15 хвилин. Після промивання PBS сайти неспецифічного зв'язування антитіл блокували протягом 30 хв. блокувальним буфером (10 % козячої сироватки в PBS) при RT, з наступною інкубацією протягом 60 хвилин з 5 мкг/мл IMAB027-FITC при RT. Потім зразки промивали 3 рази PBS та інкубували з відповідними вторинними готовими до використання антитілами (Bright Vision полі-HRP антикролик IgG, Immunologic, DPVR-110HRP) протягом 30 хв. при RT. Візуалізацію проводили протягом 2:30 хвилин з використанням розчину субстрат-хромоген (Vectorred; Vector Laboratories). Після дофарбовування гематоксином, дегідратації й приготування препаратів зрізи аналізували за допомогою мікроскопа Leica DM2000.

Лікування прогресуючих внутрішньоочеревинних PA-1(Luc) ксенотрансплантантих пухлин Лінію клітин тератокарциноми яєчника людини PA-1(Luc), яка стійко експресує люциферазу світлячка як люмінесцентного гена-репортера, використовували як модель внутрішньоочеревинної ксенотрансплантантих пухлини для дослідження протипухлинної активності кон'югованих з токсиним антитіл IMAB027 in vivo. Попередні експерименти з трансплантації клітин підтвердили, що внутрішньоочеревинна інокуляція PA-1(Luc) клітин у результаті приводить до утворення внутрішньоочеревинних пухлинних вузлів.

1×10^7 PA-1(Luc) клітин, ресуспендованих в PBS, вводили внутрішньоочеревинно самкам мишей Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu}. Біоломінесцентну візуалізацію починали на 14 день після інокулювання пухлинних клітин, і потім щотижня до завершення дослідження. D-люциферин (Perkinelmer, 122796) розчиняли в стерильній воді й вводили внутрішньоочеревинно (150 мг/кг, ін'єкційні об'єми 200 мкл) за 5 хвилин до візуалізації за допомогою системи IVIS Lumina Imaging System (Advanced Molecular Vision). Мишам робили анестезію ізофлураном, поміщали в темну камеру IVIS Lumina і визначали кількість фотонів, що випускаються, протягом 1 хвилини. Інтенсивність вихідного світла, що виходить із PA-1 клітин у тілі тварини, які експресують люциферазу, формувало псевдокольорове зображення, де синій колір – найменша інтенсивність, а червоний – сама більша інтенсивність біоломінесцентного сигналу. Півтонові фотографічні зображення мишей також були отримані при LED слабкому освітленні. Зображення накладали за допомогою програмного забезпечення Living Image (Xenogen). Для всіх зображень використовували співрозмірні налаштування освітлення. Для кількісної оцінки біоломінесценції були визначені області, які представляють інтерес (ROI) і загальний потік з відповідної ROI вимірювали у вигляді одиниць фотон/с (p/s). Значення вихідної біоломінесценції, отримане з тієї частини тварини, що не випромінює сигналу, віднімали від відповідного значення біоломінесценції для кожної тварини.

На 14 день мишей випадковим чином розподіляли по групах і лікували внутрішньоочеревинним введенням 16 мг/кг IMAB027-DM1 або IMAB027-vcMMAE, відповідно. Контрольним тваринам вводили розріджувач (буфер). Ріст пухлин реєстрували щотижня за

допомогою візуалізації біолоюмінесценції вигляду знизу й наступного аналізу загального потоку (фотонів/с) в тих областях, що представляють інтерес, які вкривають черевце миші.

Ендоцитоз

Ендоцитоз CLDN6-зв'язаних антитіл визначали з використанням аналізу ендоцитоза на основі цитотоксичності, який ґрунтується на ко-інтерналізації пов'язаного з мішенню антитіла й кон'югованого із сапоніном Fab-фрагмента проти IgG людини (Fab-ZAP human, Advanced Targeting Systems, IT-51). Сапонін є білком, який інактивує рибосому, який після інтерналізації інгібує біосинтез білка й, отже, призводить до смерті клітин.

РА-1 клітини збирали за допомогою 0,05 % трипсину/EDTA (Gibco, 25300-054) і $2,5 \times 10^3$ клітин/комірку висівали в 50 мкл ростового середовища в 96-коміркову культуральну чашку. Через 24 години додали Fab-ZAP і потім IMAB027 або ізотипове контрольне антитіло об'ємом 25 мкл кожного. CLDN6 антитіл вводили в 6 або 8 серії розведення, при цьому застосовували постійні концентрації Fab-ZAP (Fab-ZAP:антитіло співвідношення 3:1-6561:1). Клітини культивували протягом додаткових 72 годин у зволоженому інкубаторі при 37 °C і CO₂. Після цього, життєздатність клітин аналізували з використанням набору Cell Proliferation Kit II from AppliChem (AppliChem, A8088-1000) згідно з інструкціями виробника. Оптичну щільність вимірювали за допомогою спектрофотометра (Tecan) при 480 нм (стандарт 630 нм).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БІОНТЕХ АГ та інші
 <120> ДІАГНОСТИКА ТА ЛІКУВАННЯ РАКУ ЗАЛУЧЕННЯМ РАКОВИХ
 СТОВБУРОВИХ КЛІТИН
 <130> 342-79 РСТ
 <150> РСТ/EP2013/002272
 <151> 2013-07-31
 <160> 12
 <170> Патентна версія 3.5
 <210> 1
 <211> 220
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)
 <213> Homo sapiens (людина)
 <400> 1
 Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
 20 25 30
 Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
 35 40 45
 Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
 50 55 60
 Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
 85 90 95
 Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
 100 105 110
 Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
 115 120 125
 Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
 130 135 140
 Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
 165 170 175
 Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
 180 185 190
 Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
 195 200 205
 Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
 210 215 220
 <210> 2

<211> 220

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 2

```

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1           5           10           15
Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
          20           25           30
Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
          35           40           45
Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
          50           55           60
Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65           70           75           80
Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
          85           90           95
Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
          100          105          110
Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
          115          120          125
Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
          130          135          140
Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145          150          155          160
Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
          165          170          175
Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
          180          185          190
Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
          195          200          205
Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
          210          215          220

```

<210> 3

<211> 117

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 3

```

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
          20           25           30

```

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 106
<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)
<213> штучна послідовність
<220>
<223> фрагмент антитіла
<400> 4

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu His
20 25 30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr Ser
35 40 45
Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 5
<211> 117
<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)
<213> штучна послідовність
<220>
<223> фрагмент антитіла
<400> 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 6

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr Ser
35 40 45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 117

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110
Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 8

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser
35 40 45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 117

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 9

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

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Gly Ile Tyr Ser
35 40 45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 12
<211> 106
<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Фрагмент антитіла
<400> 12

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
20 25 30
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
35 40 45
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50 55 60
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
65 70 75 80
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 10

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
 20 25 30
 Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 11

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Gly Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Фрагмент антитіла

<400> 12

Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 20 25 30
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Ser Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

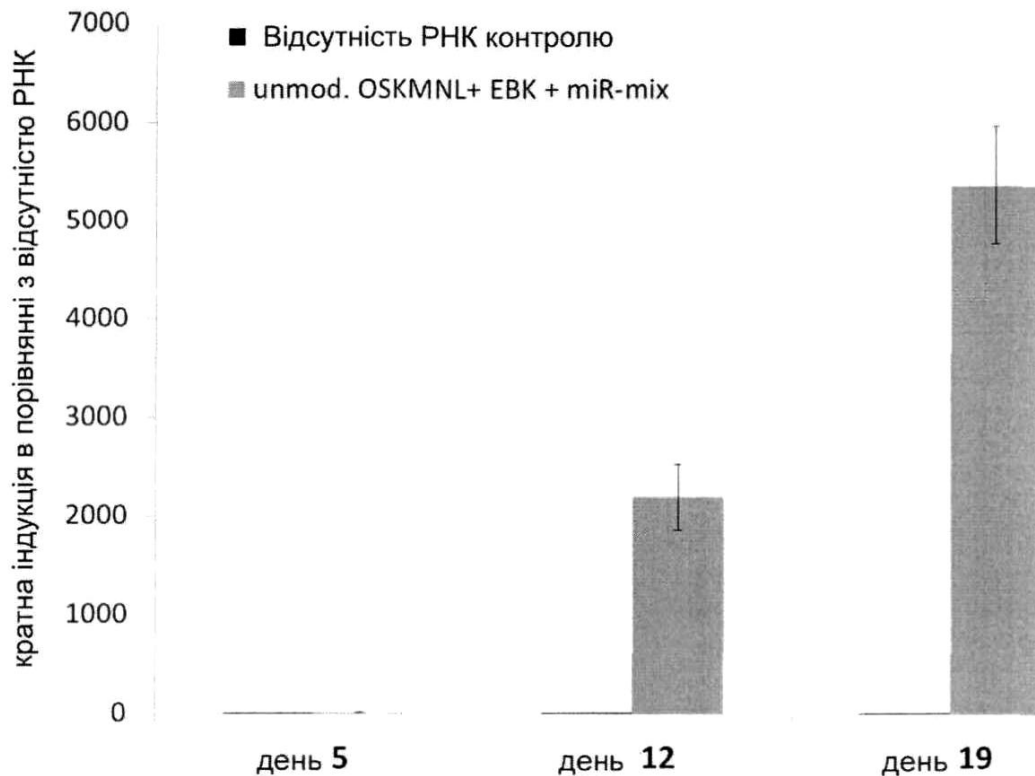
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який включає інгібування й/або знищення ракових стовбурових клітин, які експресують CLDN6, шляхом введення комбінованої терапії пацієнтові, яка включає синергійно ефективні кількості хіміотерапії і антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, де антитіло здатне опосередкувати знищення клітин, які експресують CLDN6 за допомогою
- 10 ADCC і/або CDC, і містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 5, і варіабельну область легкого ланцюга (VL), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 4, і де хіміотерапія включає агент, вибраний з групи, яка складається з карбоплатину, гемцитабіну, паклітакселю і цисплатину, доксорубіцину, топотекану і РЕВ.
- 15 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково включає застосування променевої терапії.
3. Спосіб лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який включає введення (i) антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, і (ii) хіміотерапії онкологічному пацієнтові,

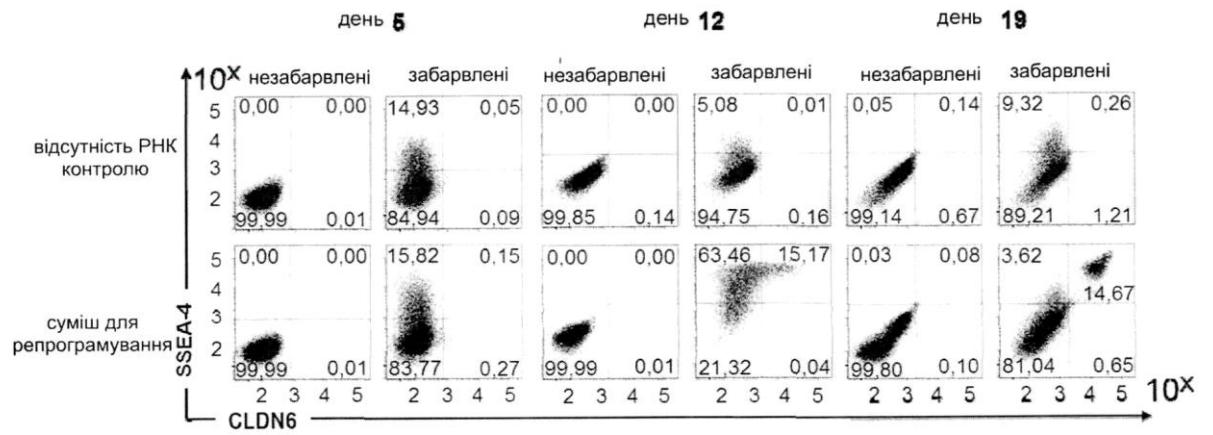
- де антитіло і хіміотерапія вводяться в синергійно ефективних кількостях, де антитіло здатне опосередкувати знищення клітин, які експресують CLDN6 за допомогою ADCC і/або CDC, і містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 5, і варіабельну область легкого ланцюга (VL), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 4, і де хіміотерапія включає агент, вибраний з групи, яка складається з карбоплатину, гемцитабіну, паклітакселю і цисплатину, доксорубіцину, топотекану і РЕВ.
- 5 4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що в ньому рак включає ракові стовбурові клітини, які експресують CLDN6.
- 10 5. Спосіб за п. 3 або 4, який **відрізняється** тим, що в ньому введення антитіла, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, приведе до інгібування або знищення ракових стовбурових клітин, які експресують CLDN6.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що в ньому хіміотерапія вводиться в дозі, нижчій, ніж максимально переносима доза.
- 15 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що в ньому хіміотерапія включає цисплатин і введення на додаток етопозиду і блеоміцину.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що в ньому рак є резистентним до хіміотерапії, зокрема, якщо вона вводиться у вигляді монотерапії.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло з'єднане з терапевтичною молекулою.
- 20 10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що в ньому терапевтична молекула є цитотоксичним засобом, хіміотерапевтичним засобом або радіоактивною речовиною.
11. Спосіб за п. 9 або 10, який **відрізняється** тим, що в ньому терапевтична молекула діє на клітини, для яких характерний повільний ріст.
- 25 12. Спосіб лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який передбачає введення онкологічному пацієнтові кон'югата антитіло-лікарський засіб, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6, ковалентно зв'язане за допомогою лінкера щонайменше з однією молекулою токсичного лікарського засобу, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 5, і варіабельну область легкого ланцюга (VL), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 4, і де молекулою лікарського засобу є N2'-деацетил-N2'(3-меркапто-1-оксопропіл)-майтансин (мертансин або DM1) або монометилауристатин Е (ММАЕ).
- 30 13. Спосіб за п. 12, який **відрізняється** тим, що в ньому молекула токсичного лікарського засобу здатна проникати крізь клітинну мембрану.
- 35 14. Спосіб за будь-яким з пп. 12-13, який **відрізняється** тим, що в ньому лінкер є розщеплювальним лінкером.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 12-14, який **відрізняється** тим, що в ньому лінкер є лінкером, який розщеплюється катепсином.
- 40 16. Спосіб за будь-яким з пп. 12-15, який **відрізняється** тим, що в ньому антитіло з'єднується з лінкером через тіол цистеїну антитіла.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 12-16, який **відрізняється** тим, що в ньому рак включає ракові стовбурові клітини, які експресують CLDN6.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 12-17, який **відрізняється** тим, що додатково включає введення хіміотерапії й/або променевої терапії.
- 45 19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-18, який **відрізняється** тим, що в ньому CLDN6 має амінокислотну послідовність відповідно до SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що в ньому рак включає первинний рак, прогресуючий рак, метастатичний рак, рецидиву раку або їх комбінацію.
- 50 21. Спосіб запобігання хеморезистентності раку, рецидиву раку або утворення метастазів раку, зокрема, під час або після лікування раку, який передбачає лікування раку способами за будь-яким з пп. 1-20.
22. Кон'югат антитіло-лікарський засіб для лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який містить антитіло, яке має здатність зв'язуватися з CLDN6 і ковалентно зв'язане лінкером щонайменше з однією молекулою токсичного лікарського засобу, де антитіло містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 5, і варіабельну область легкого ланцюга (VL), що включає амінокислотну послідовність, представлену SEQ ID NO: 4, і де молекулою лікарського засобу є N2'-деацетил-N2'(3-меркапто-1-оксопропіл)-майтансин (мертансин або DM1) або монометилауристатин Е (ММАЕ).
- 60

23. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що в ньому лінкер є розщеплюваним лінкером.
24. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 22 або 23, який **відрізняється** тим, що лінкер є лінкером, який розщеплюється катепсином.
- 5 25. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким з пп. 22-24, який **відрізняється** тим, що антитіло з'єднується з лінкером через тіол цистеїну антитіла.
26. Фармацевтична композиція для лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, яка містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким з пп. 22-25 і фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або ексципієнт.
- 10 27. Набір для лікування раку, що характеризується раковими клітинами, які експресують CLDN6, який включає перший контейнер, який містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким з пп. 22-25, і другий контейнер, який містить хіміотерапевтичний засіб.
28. Набір за п. 27, який **відрізняється** тим, що додатково містить друковані інструкції для застосування набору.

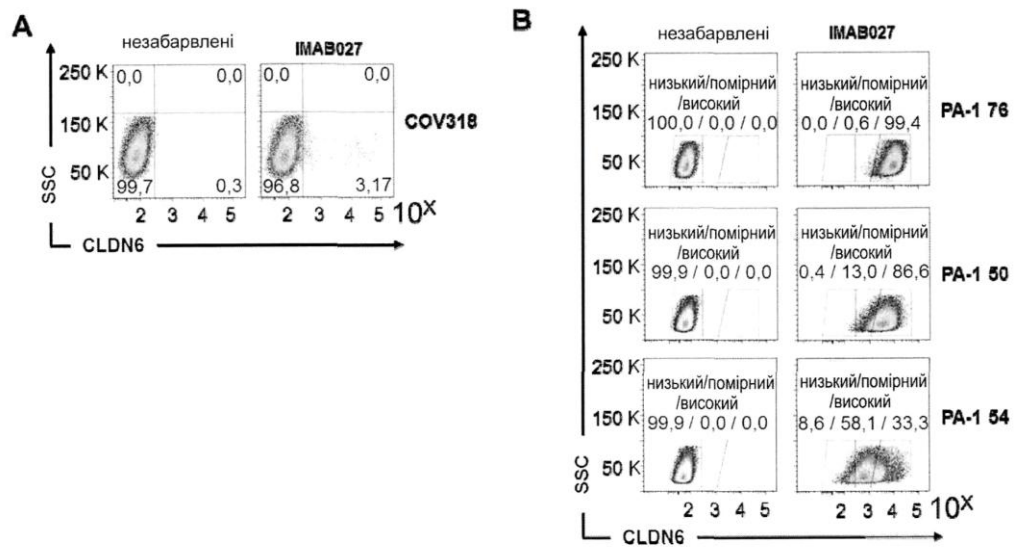
Експресія CLDN6 в iPS клітинах



Фіг. 1

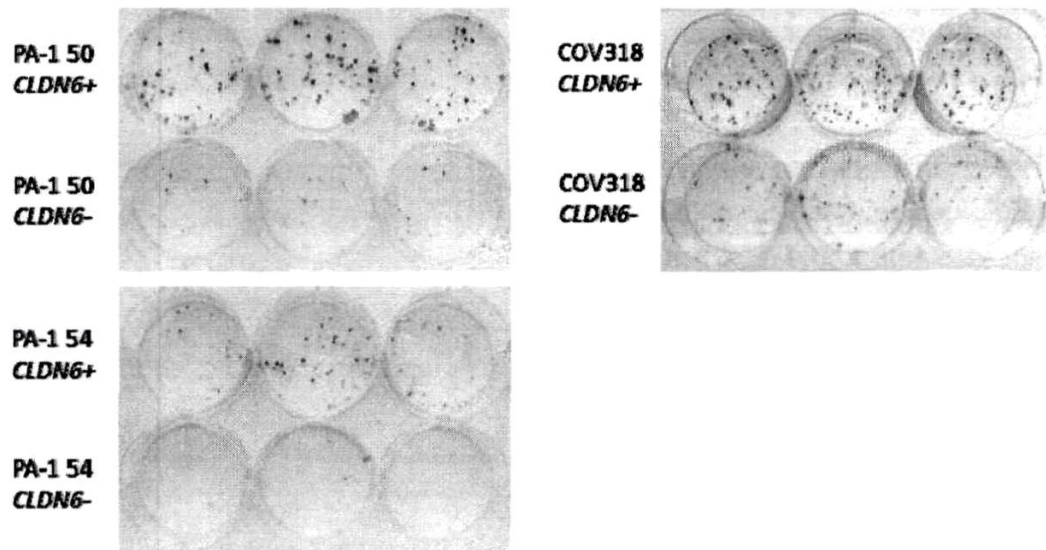


Фіг. 2

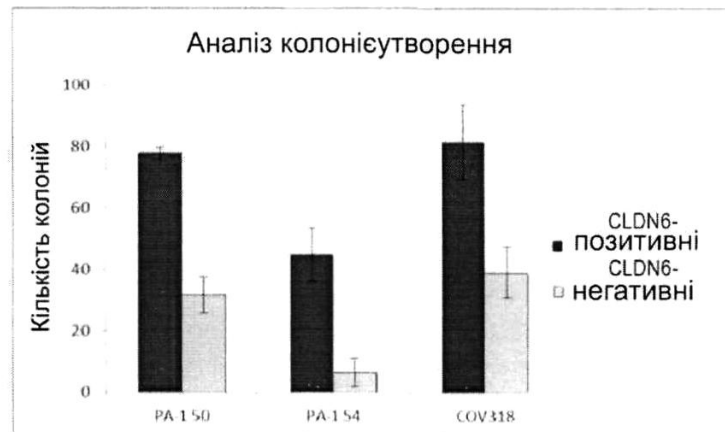


Фіг. 3

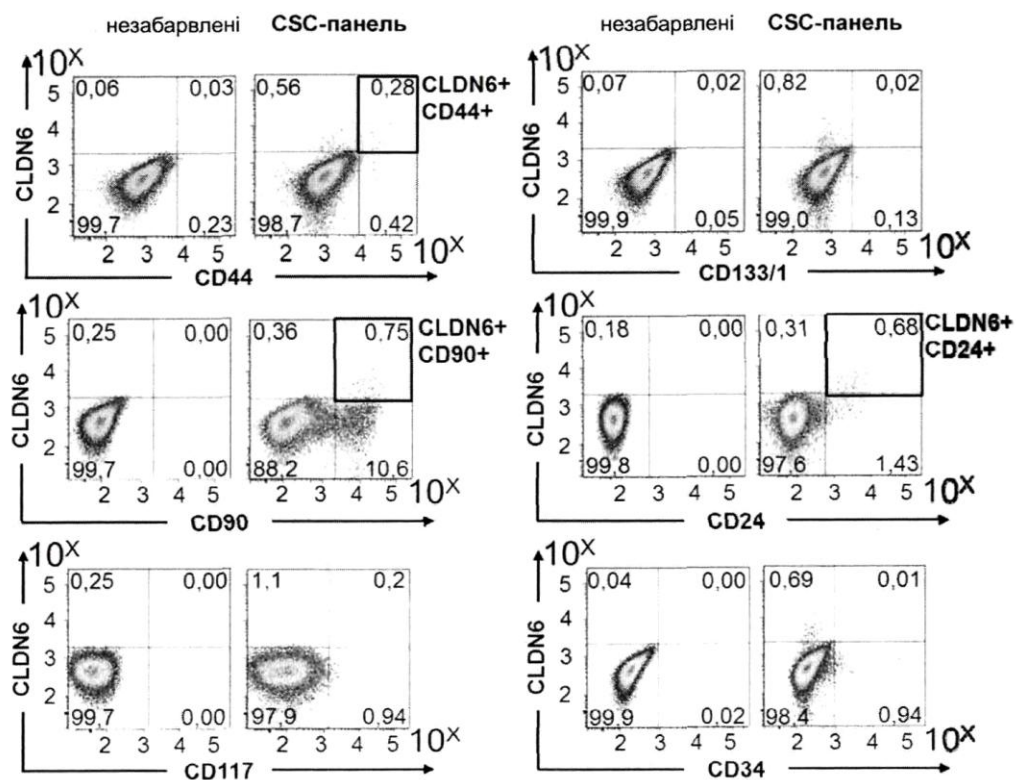
A



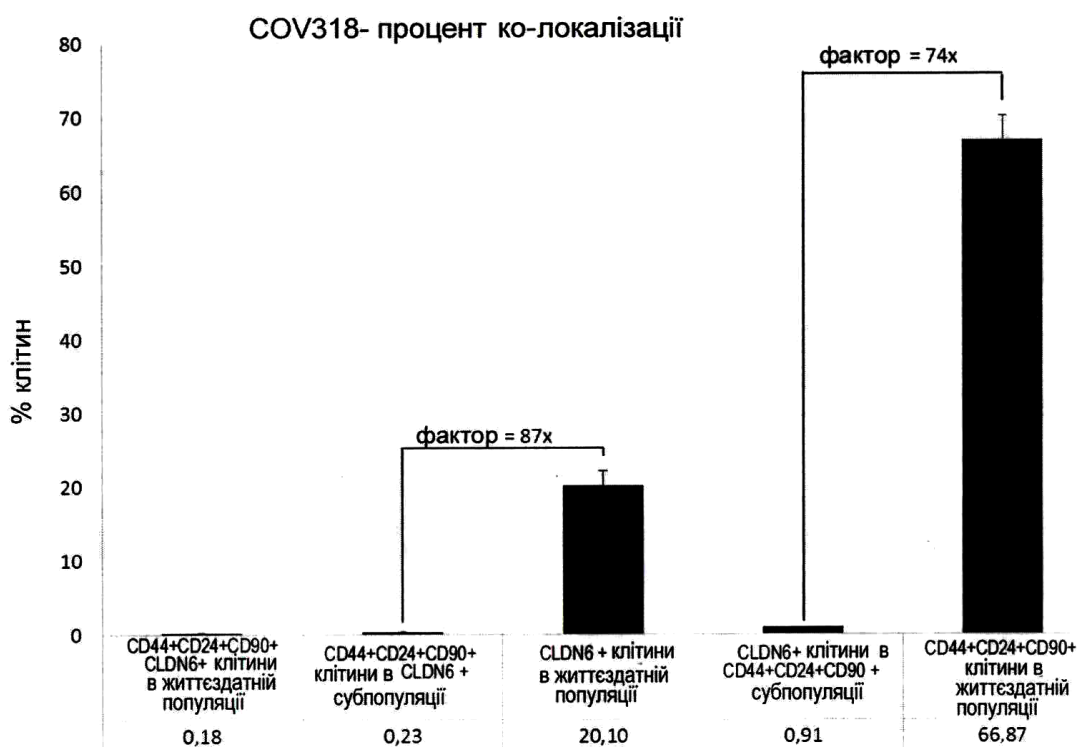
B



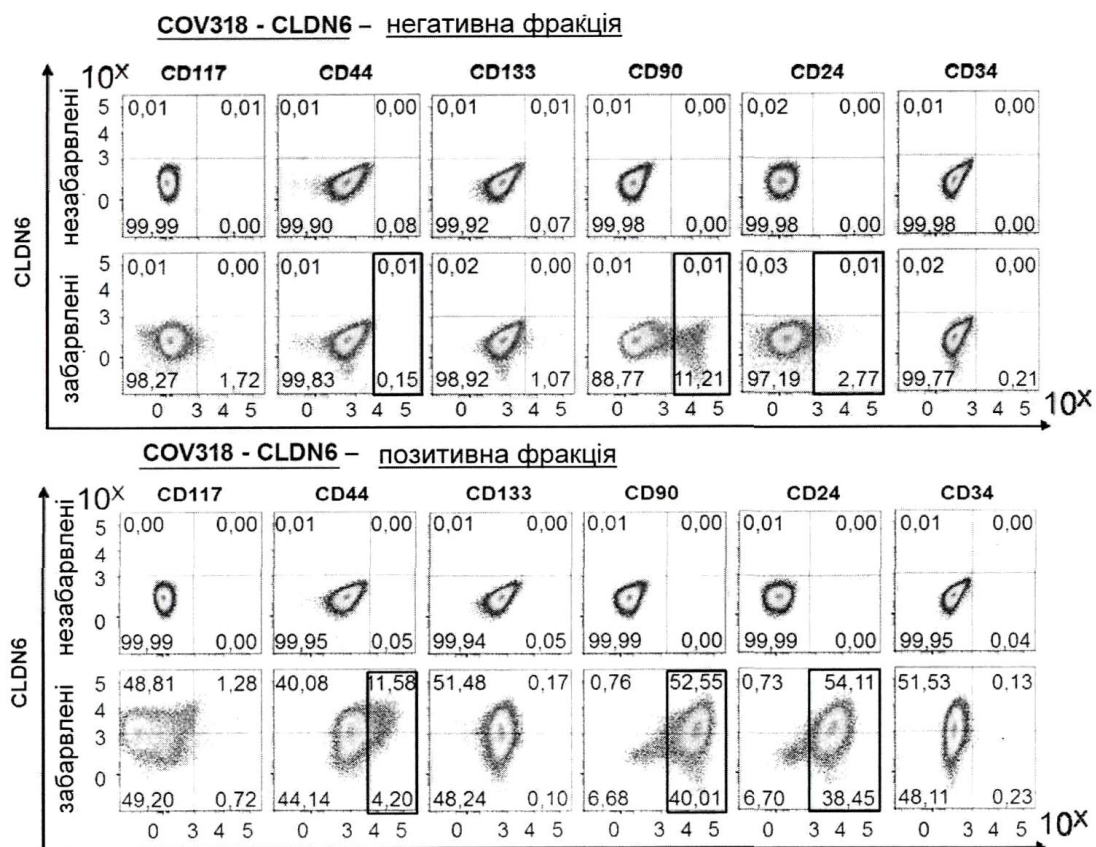
Фіг. 4



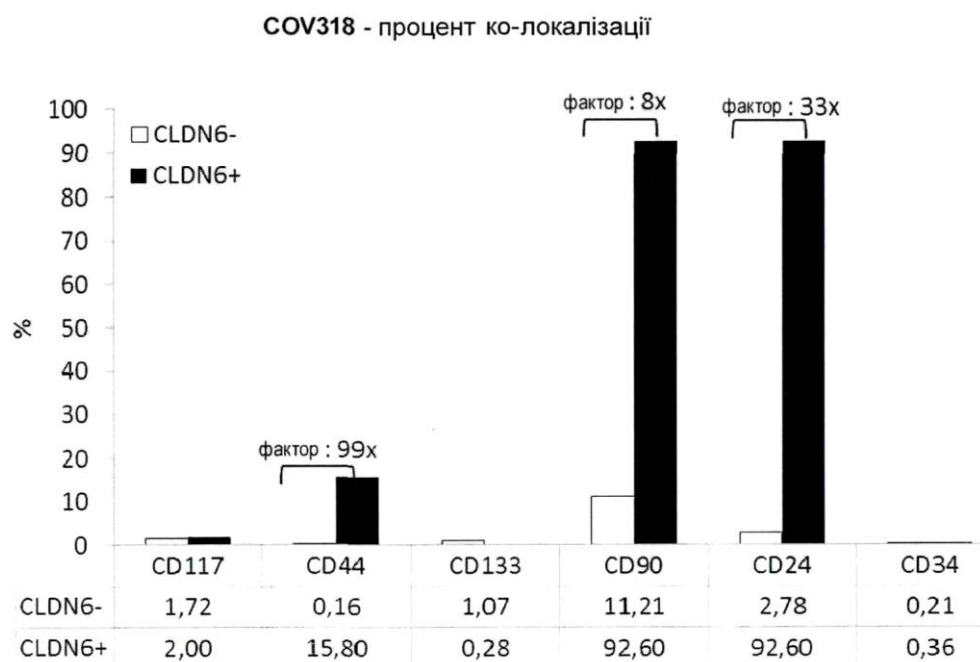
Фіг. 5А



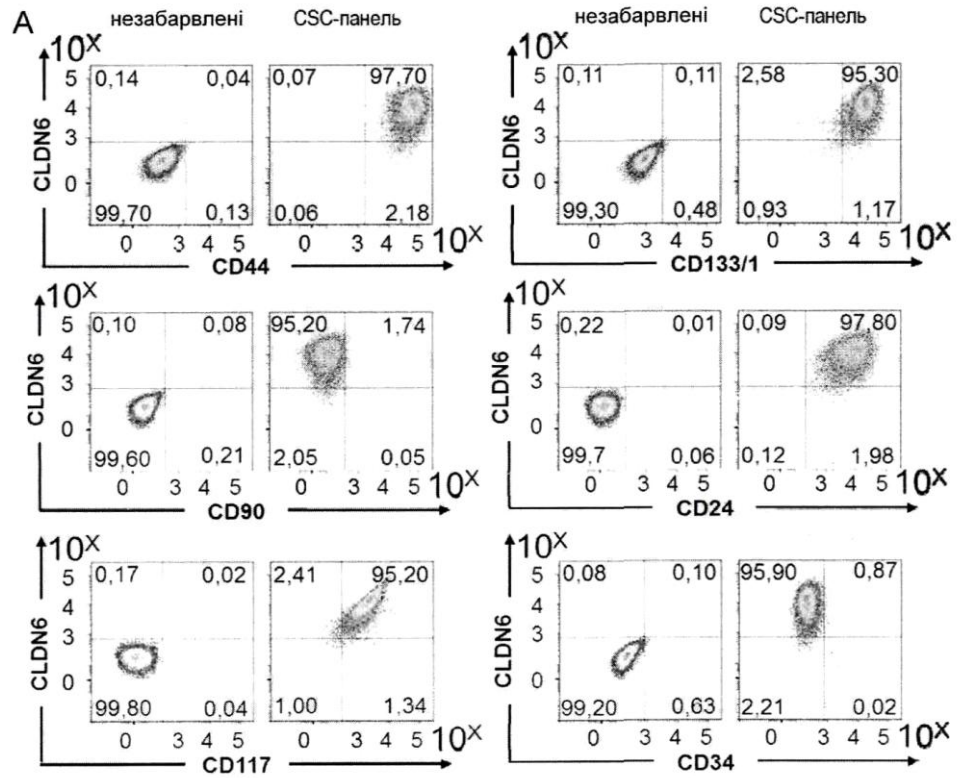
Фіг. 5В



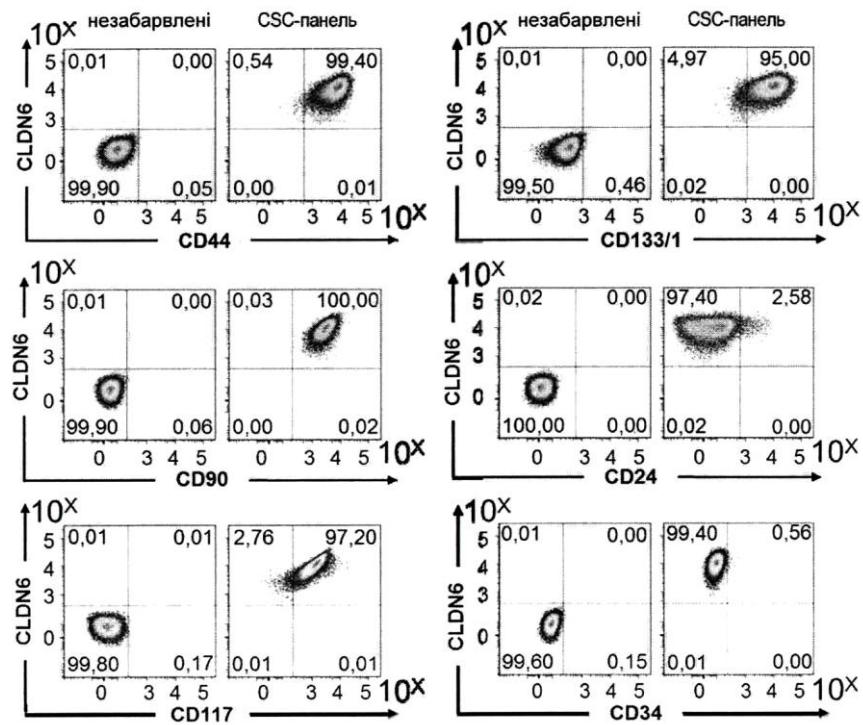
Фіг. 6A



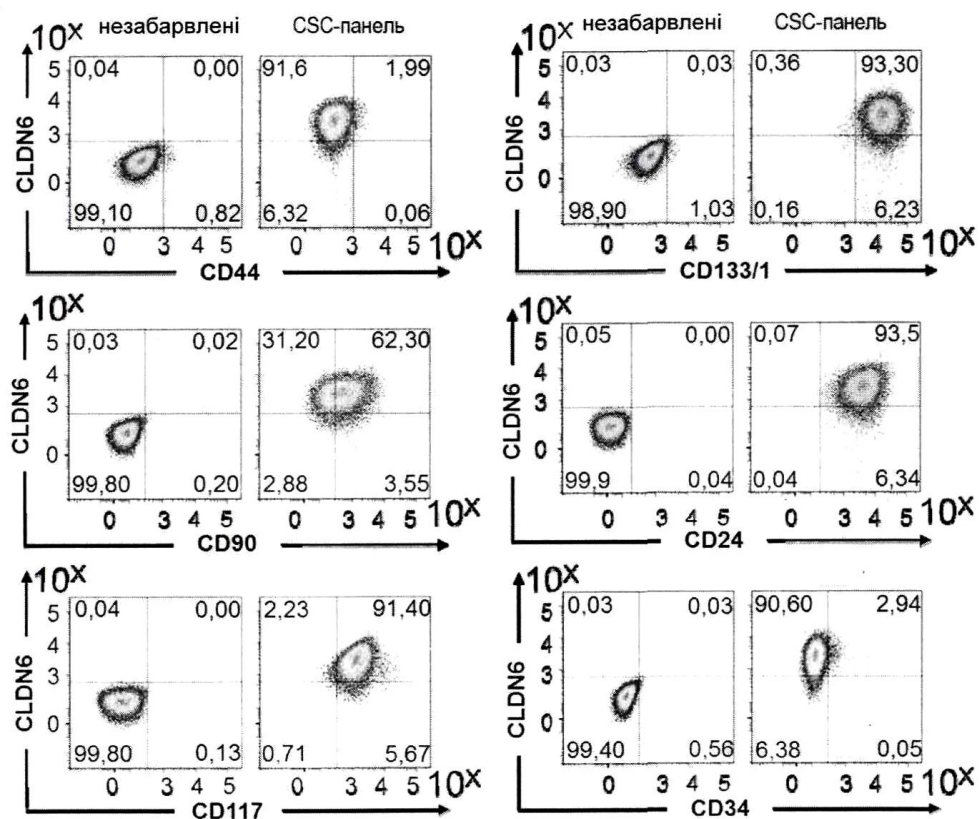
Фіг.6B



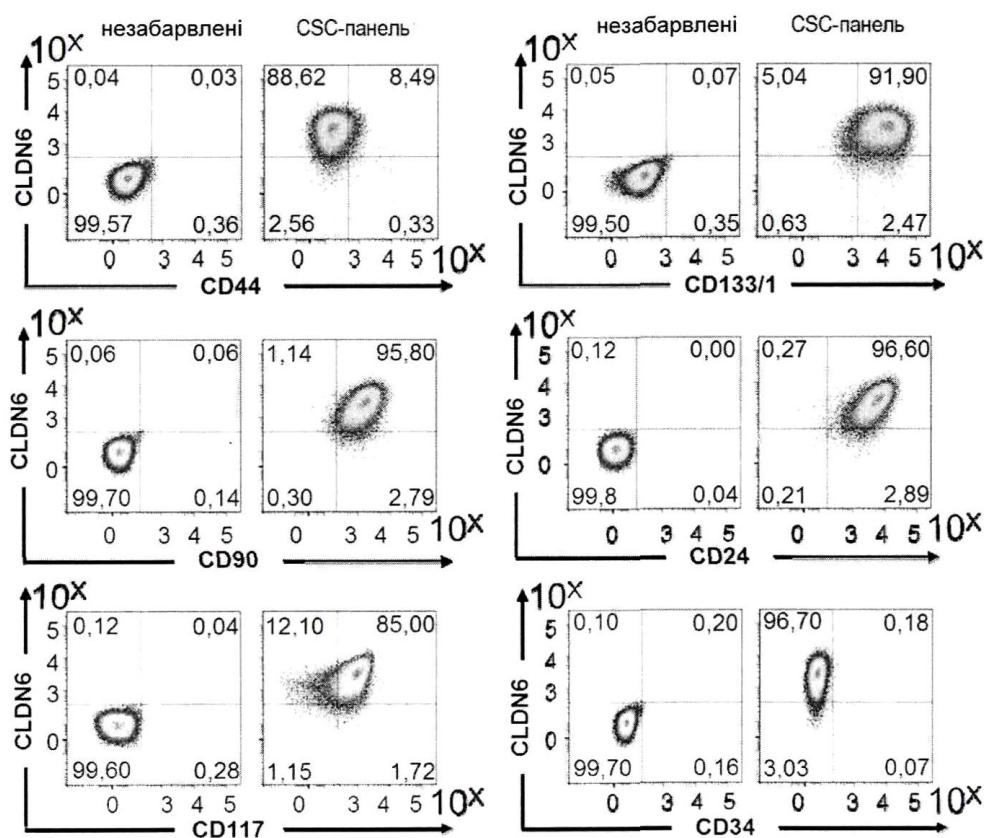
Фіг. 7A



Фіг. 7B

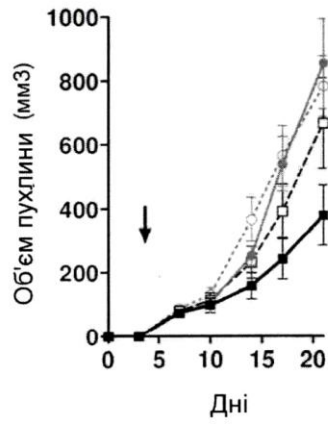


Фіг. 7C

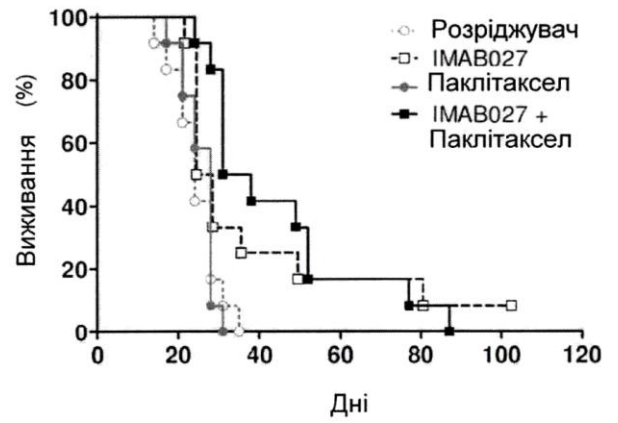


Фіг. 7D

(A)

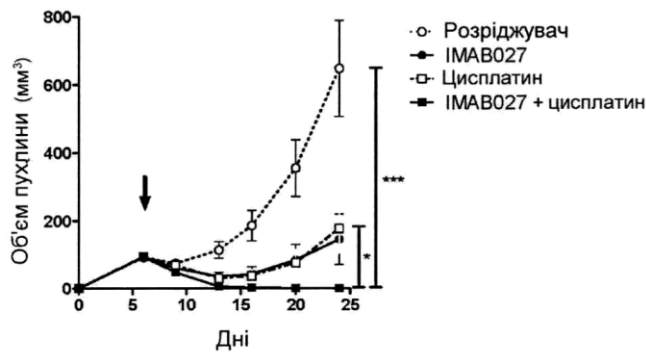


(B)

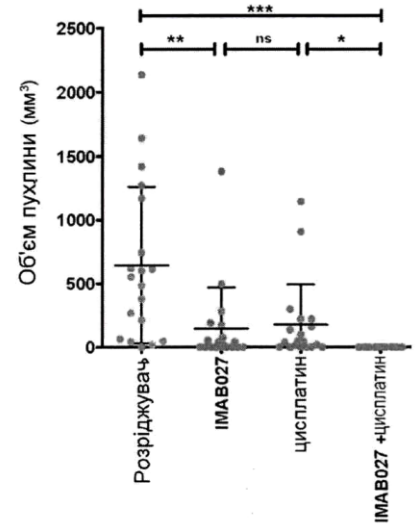


Фіг.8

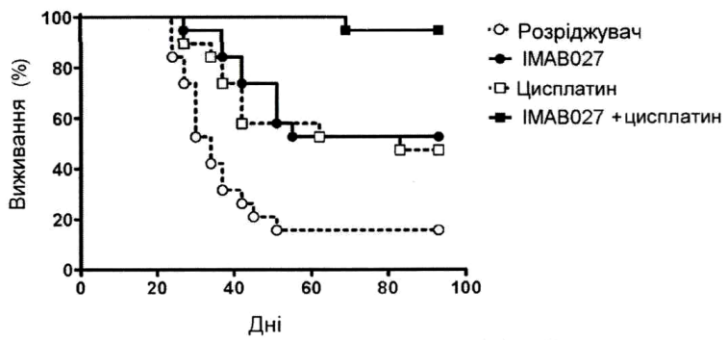
(A)



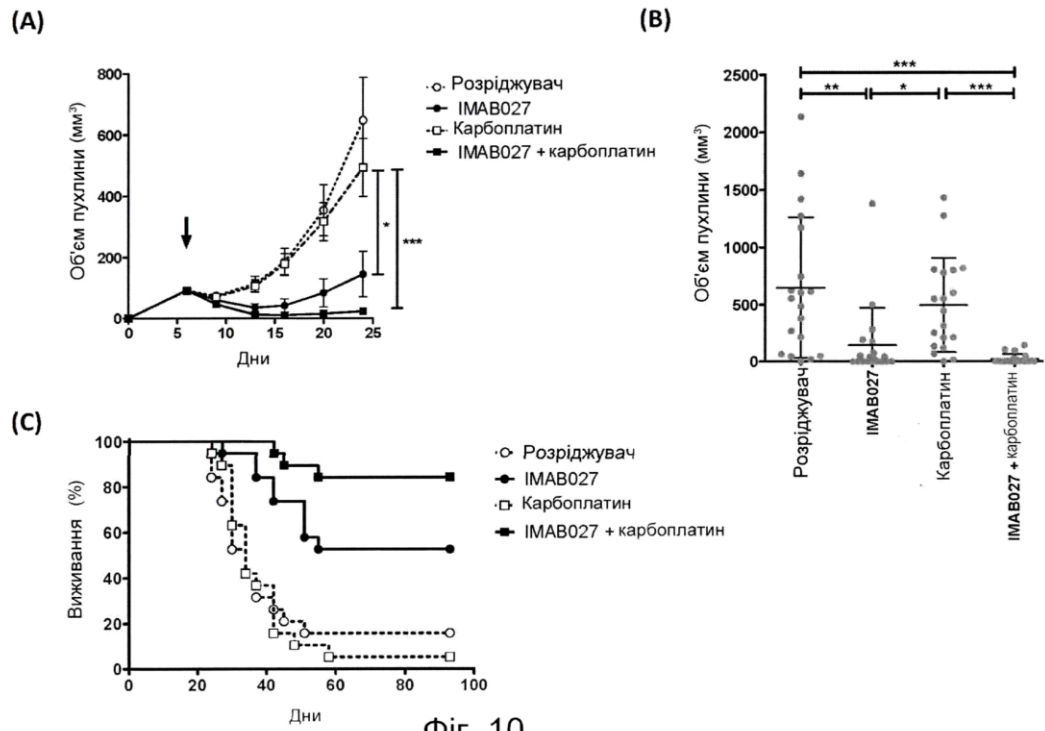
(B)



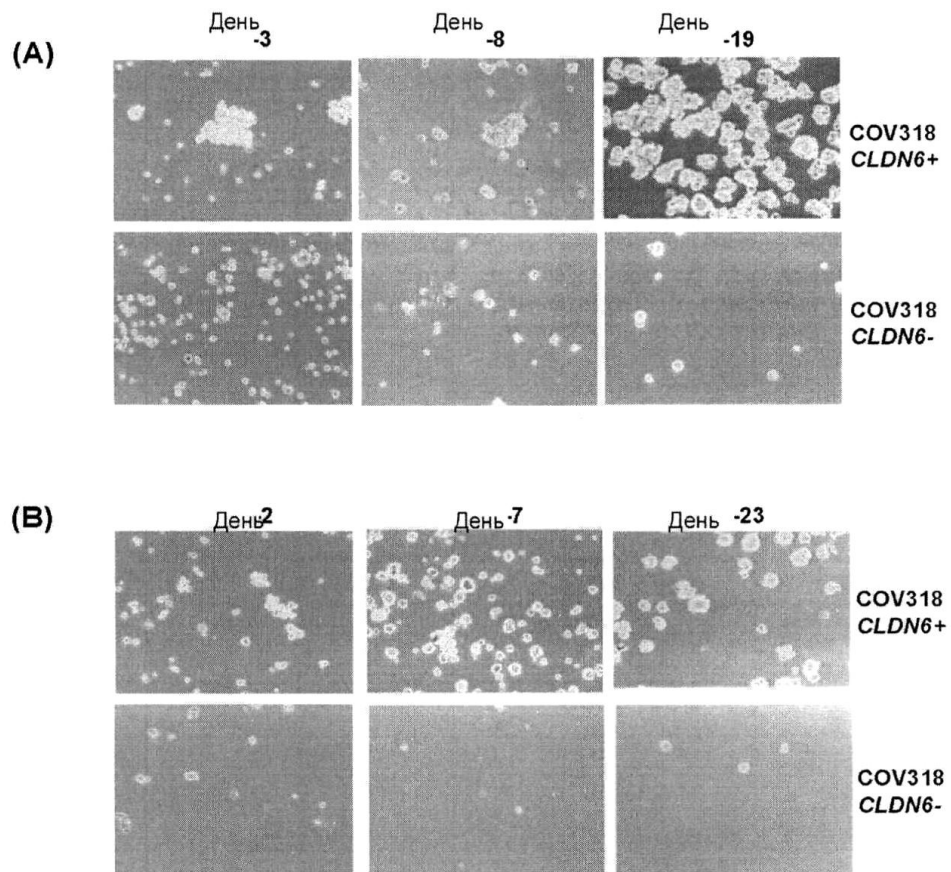
(C)



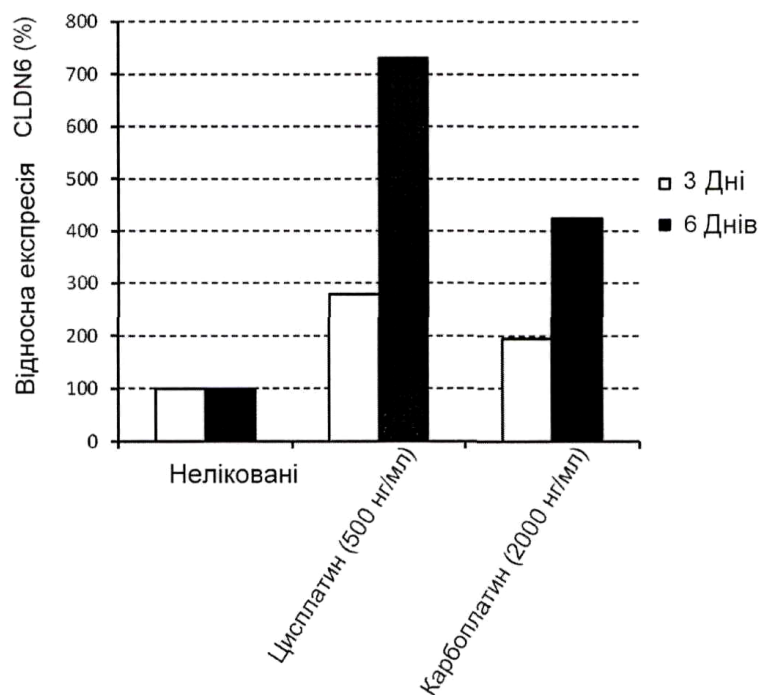
Фіг. 9



Фіг. 10

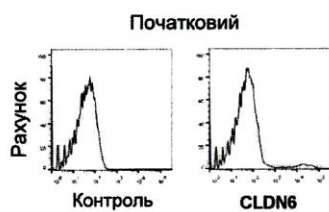


Фіг.11

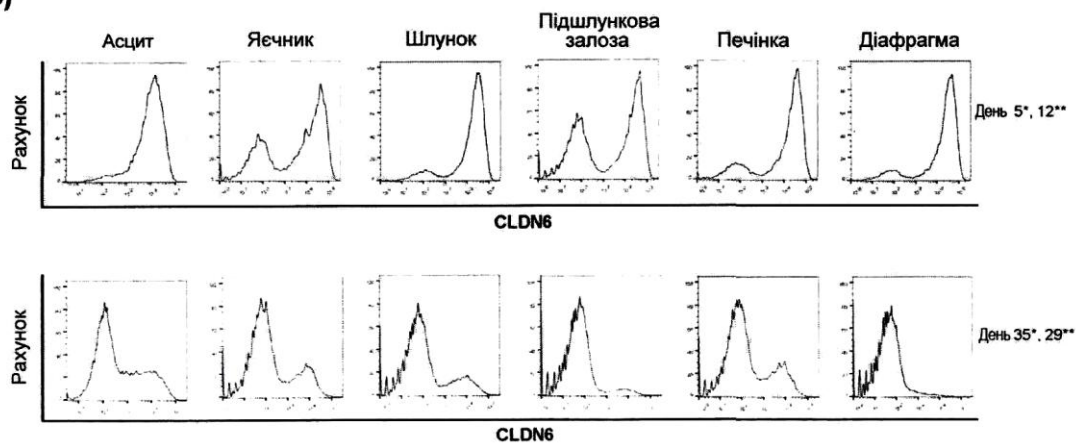


Фіг. 12

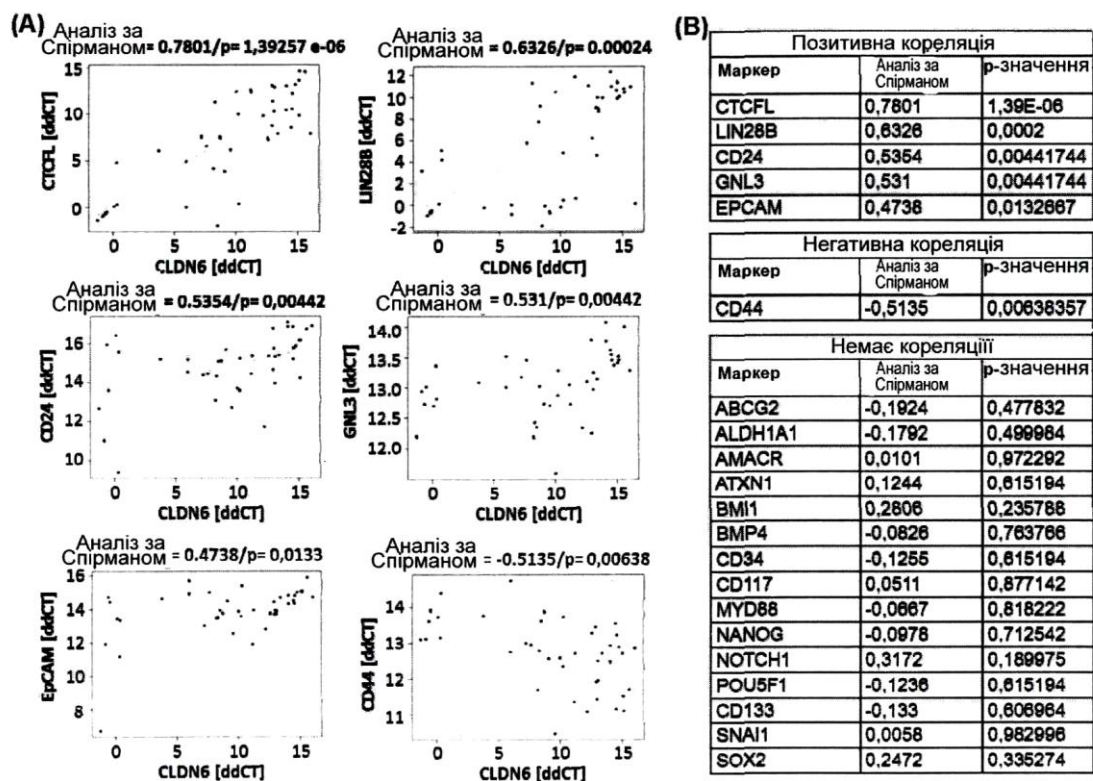
(A)



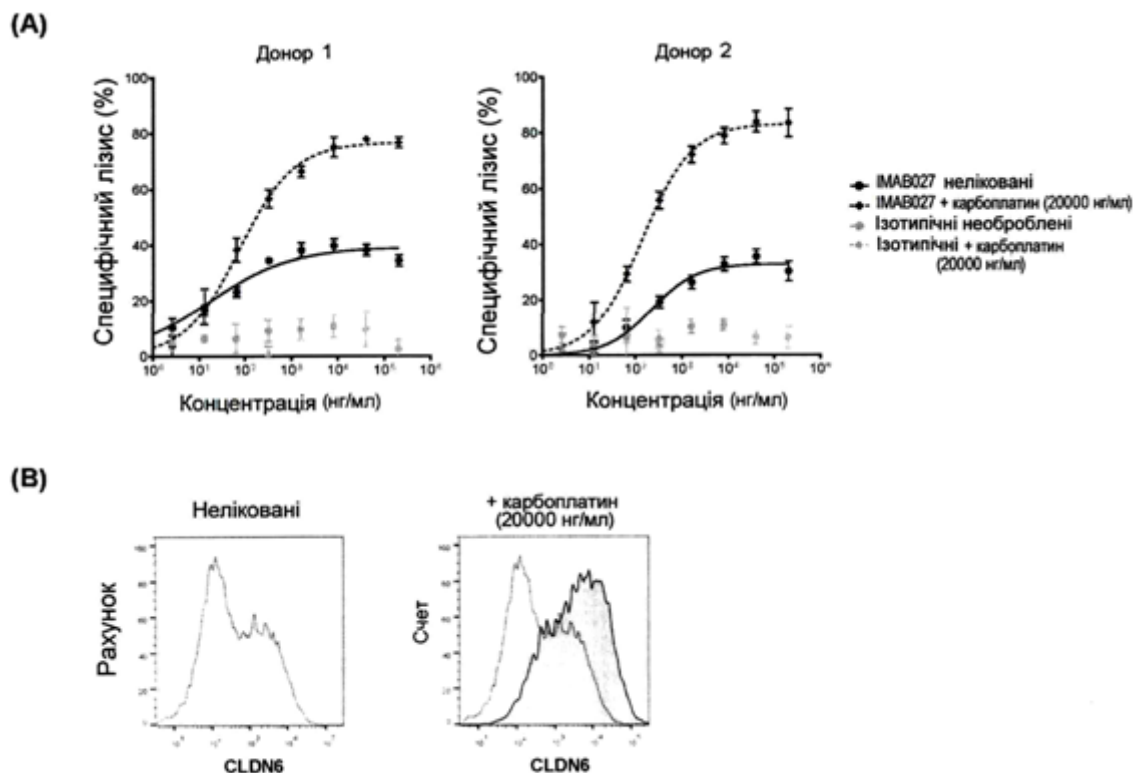
(B)



Фіг. 13

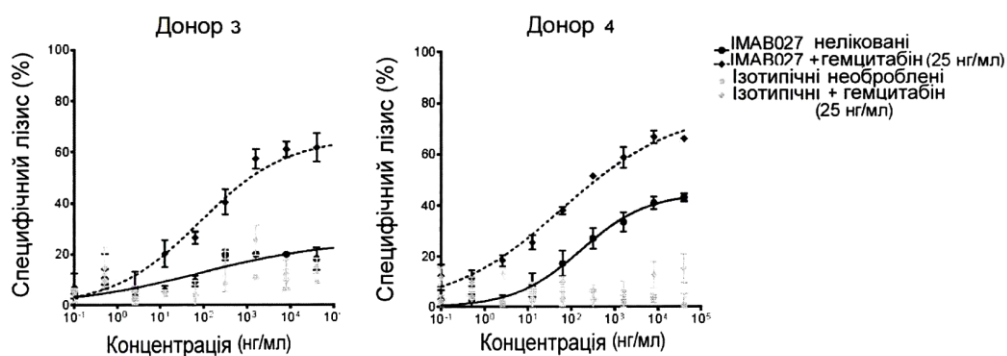


Фіг. 14

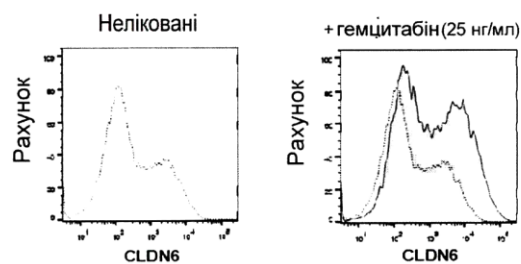


Фіг. 15

(C)

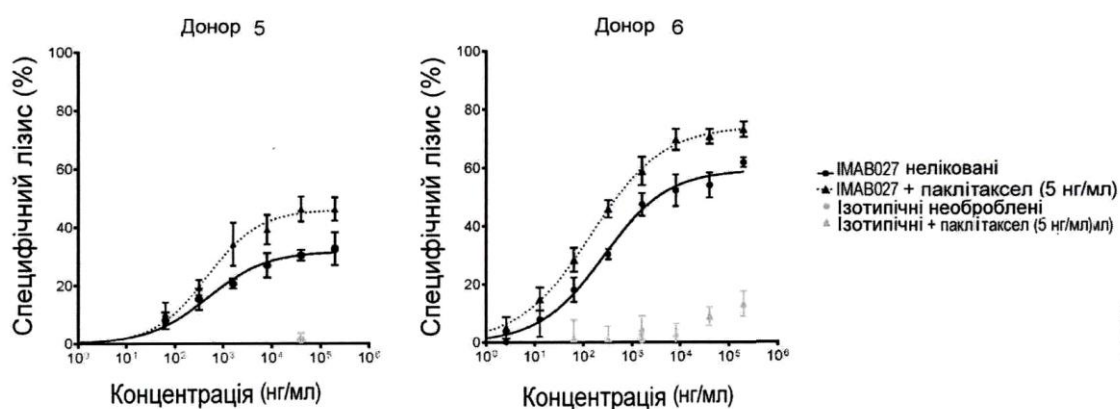


(D)

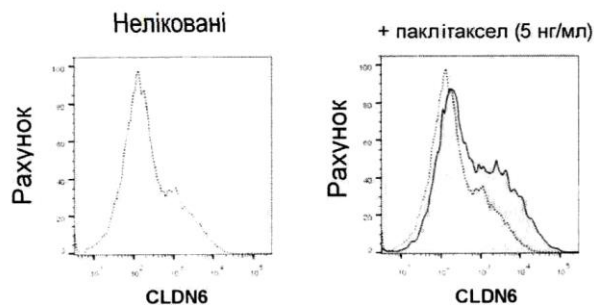


Фіг. 15 (продовження)

(E)

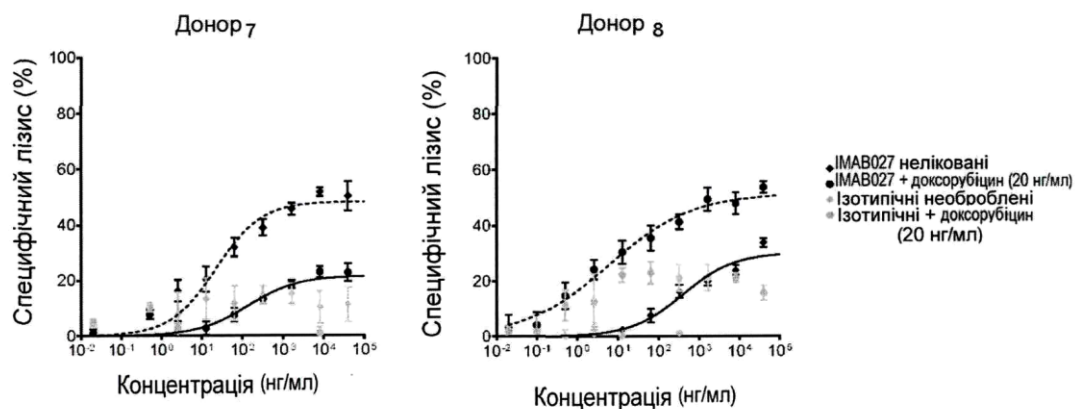


(F)

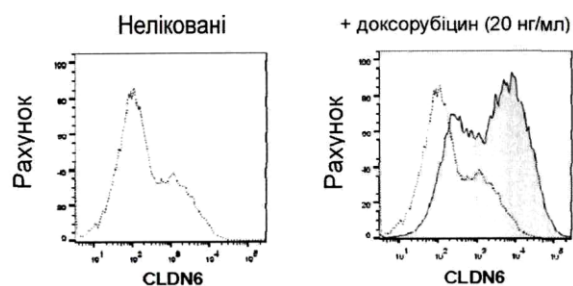


Фіг. 15 (продовження)

(G)

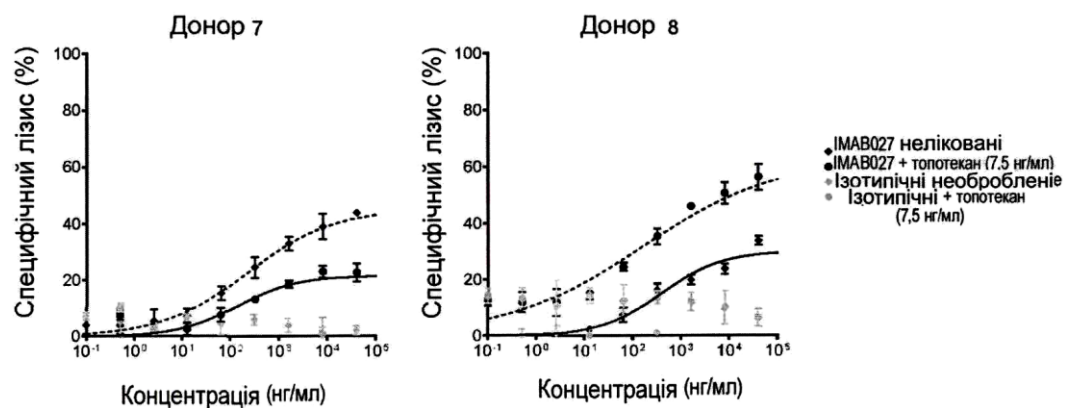


(H)

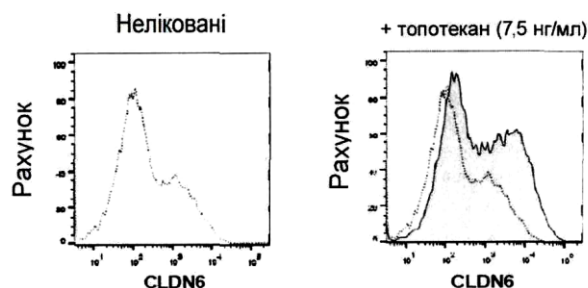


Фіг. 15 (продовження)

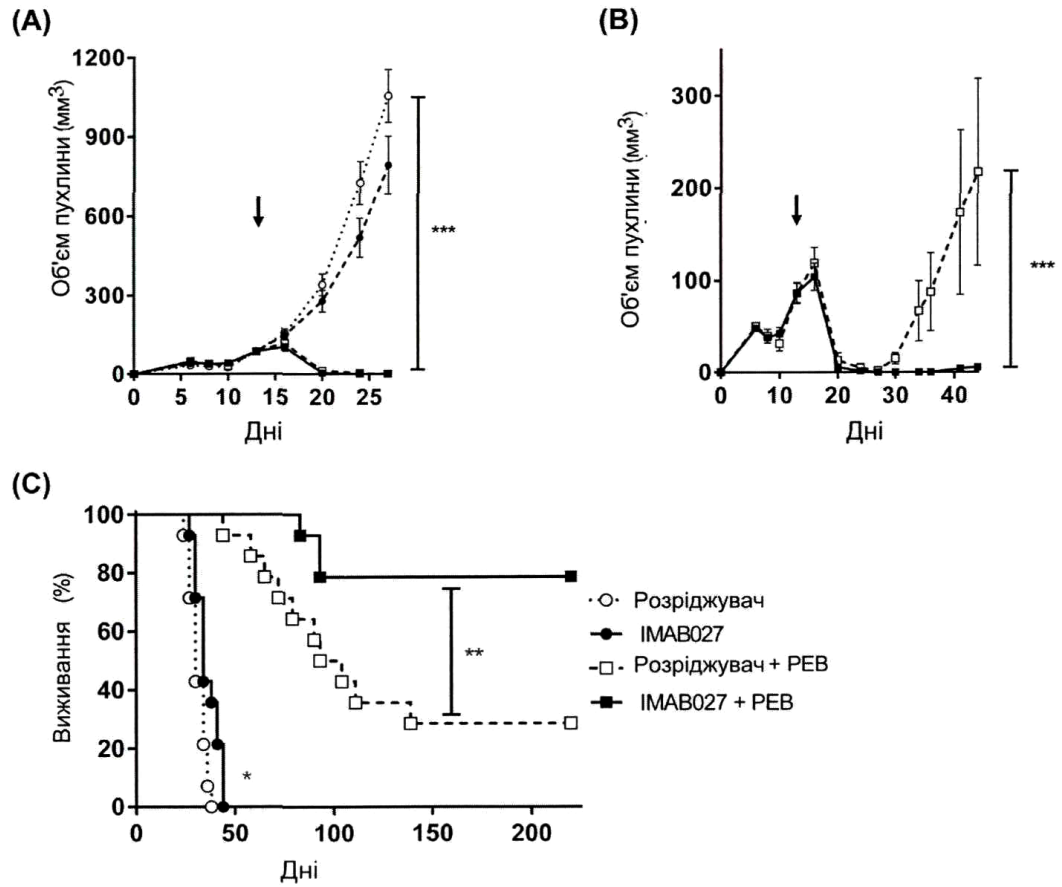
(I)



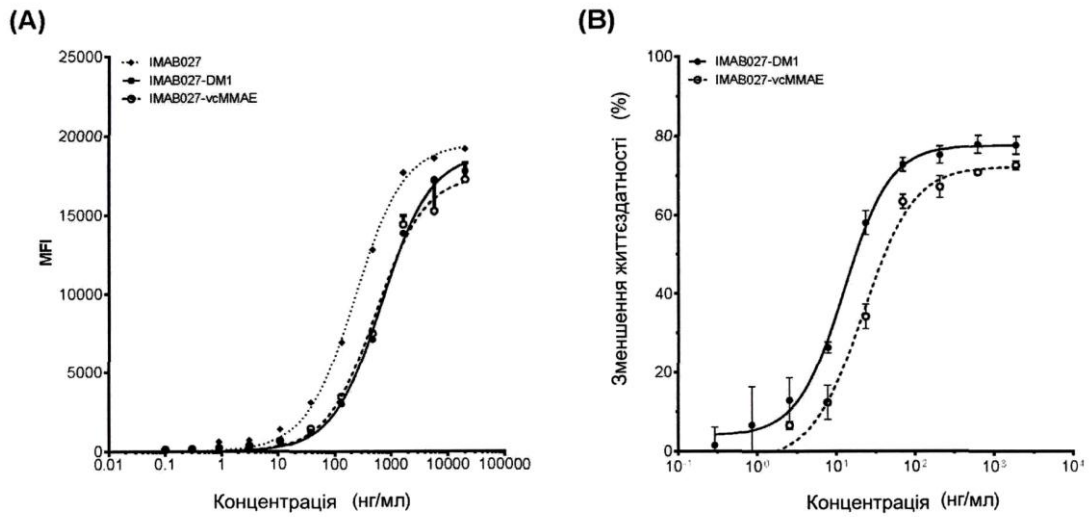
(J)



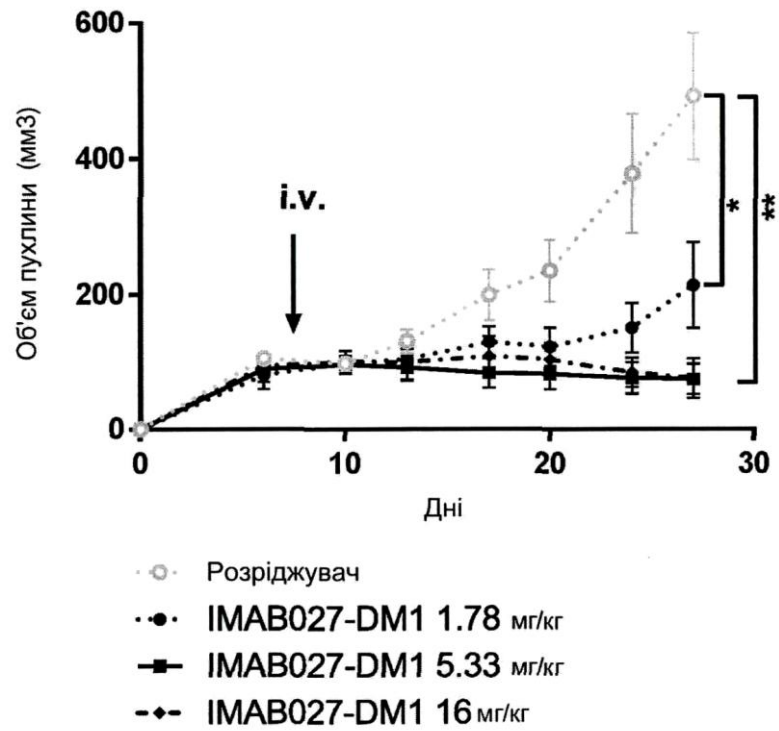
Фіг. 15 (продовження)



Фіг. 16

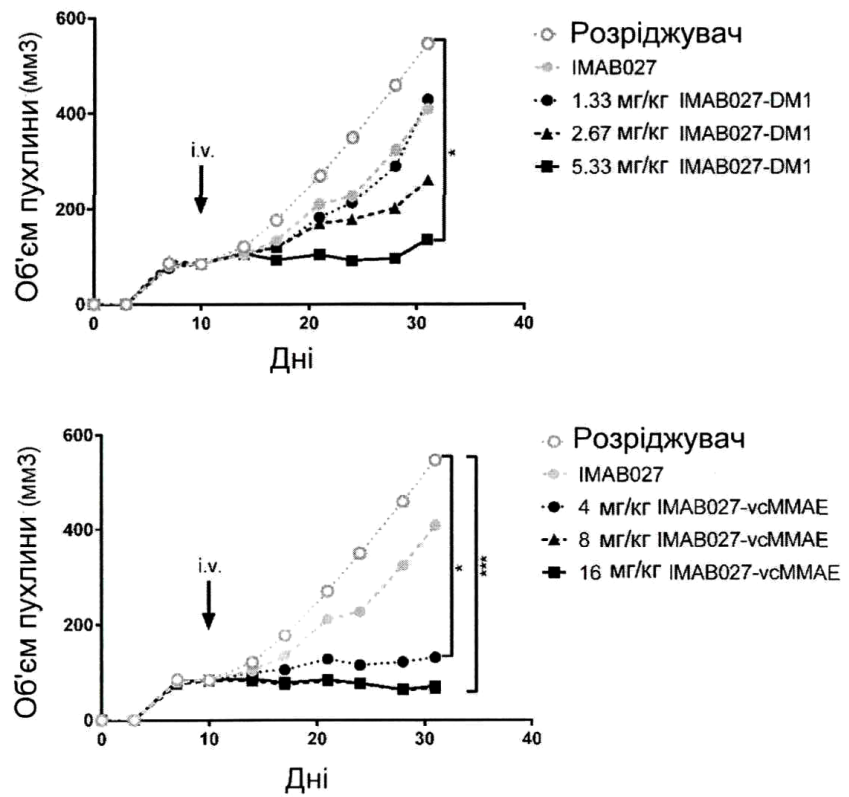


Фіг. 17



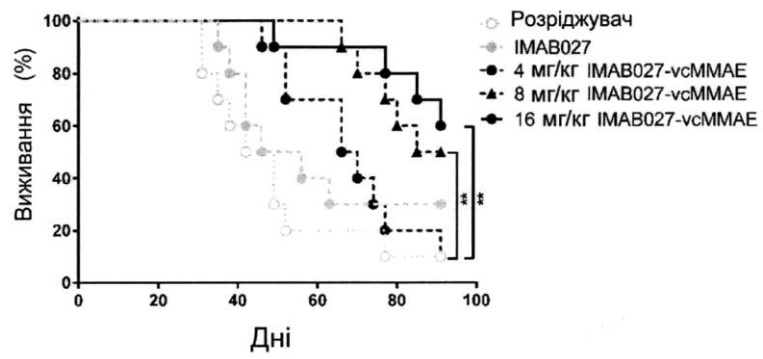
Фіг. 18

(A)



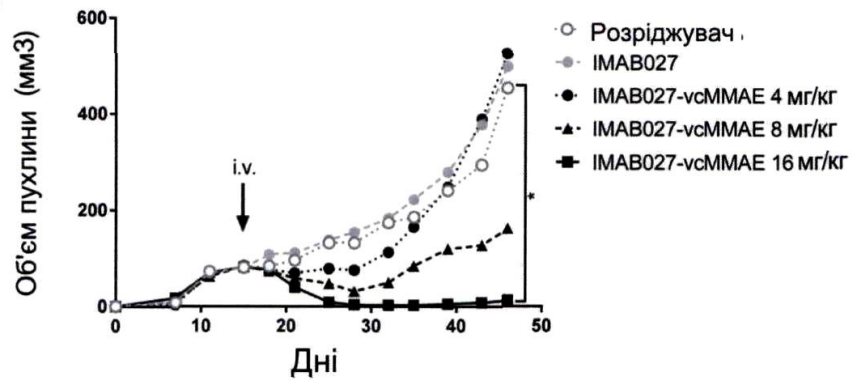
Фіг. 19

(В)

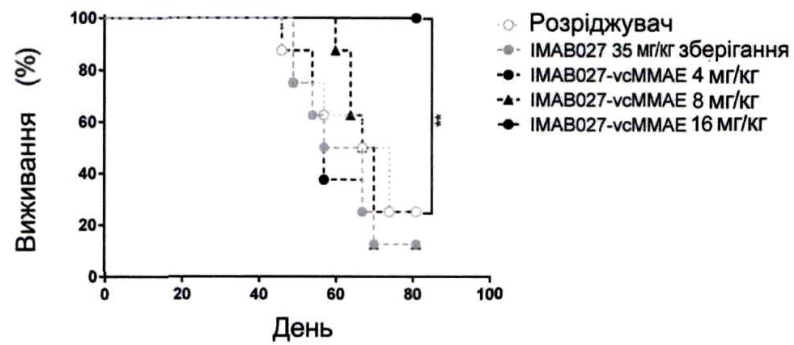


Фіг. 19 (продовження)

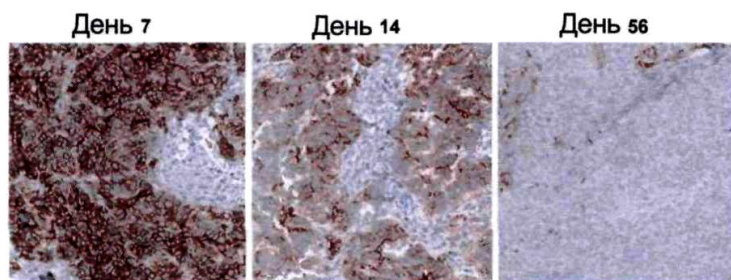
(А)



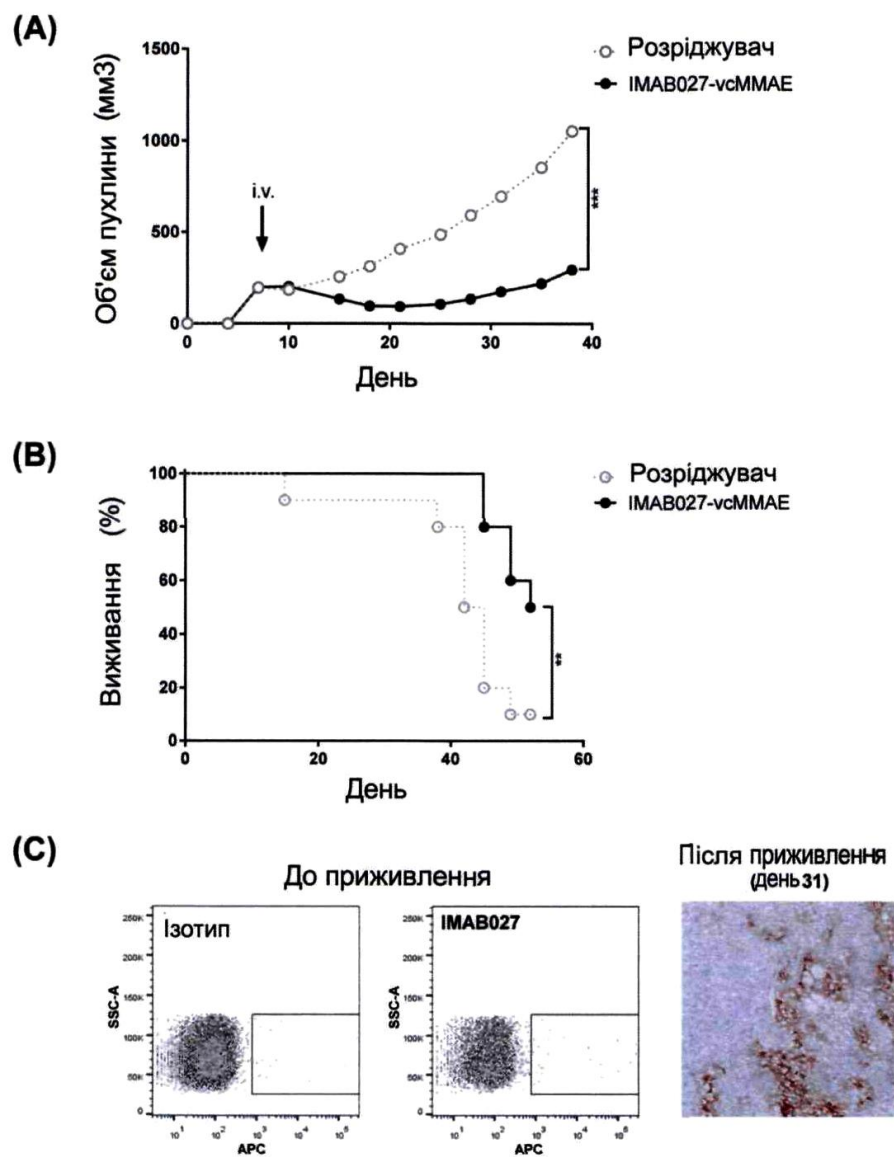
(В)



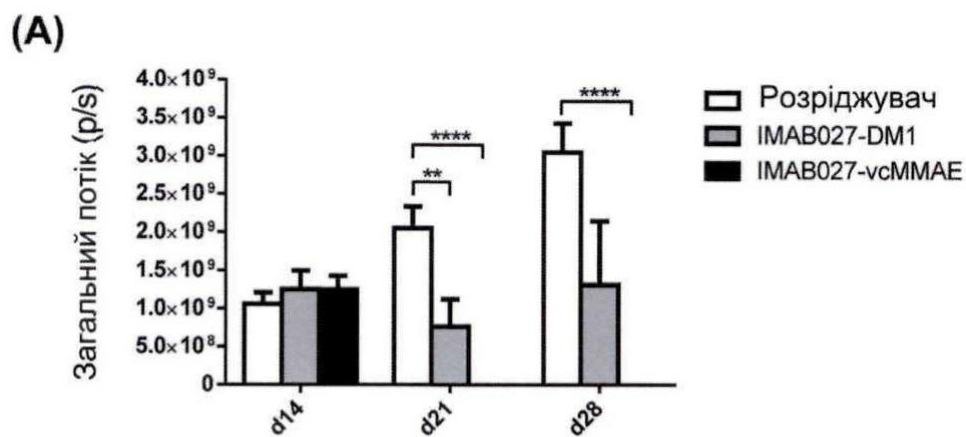
(С)



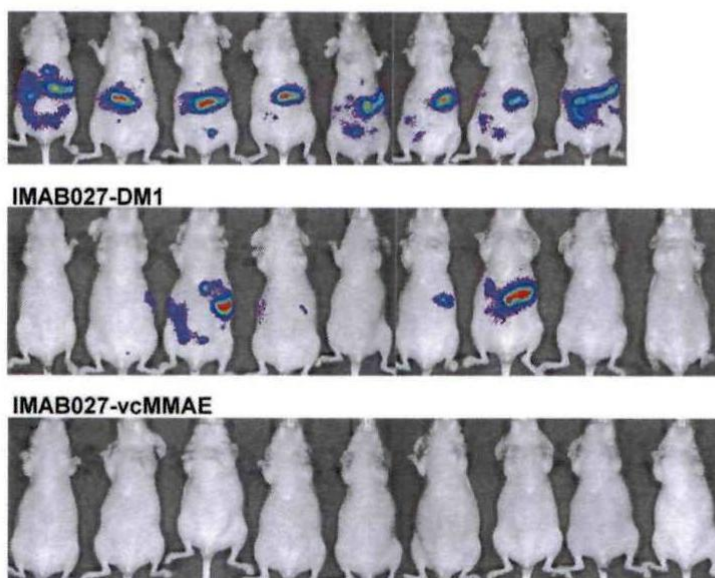
Фіг. 20



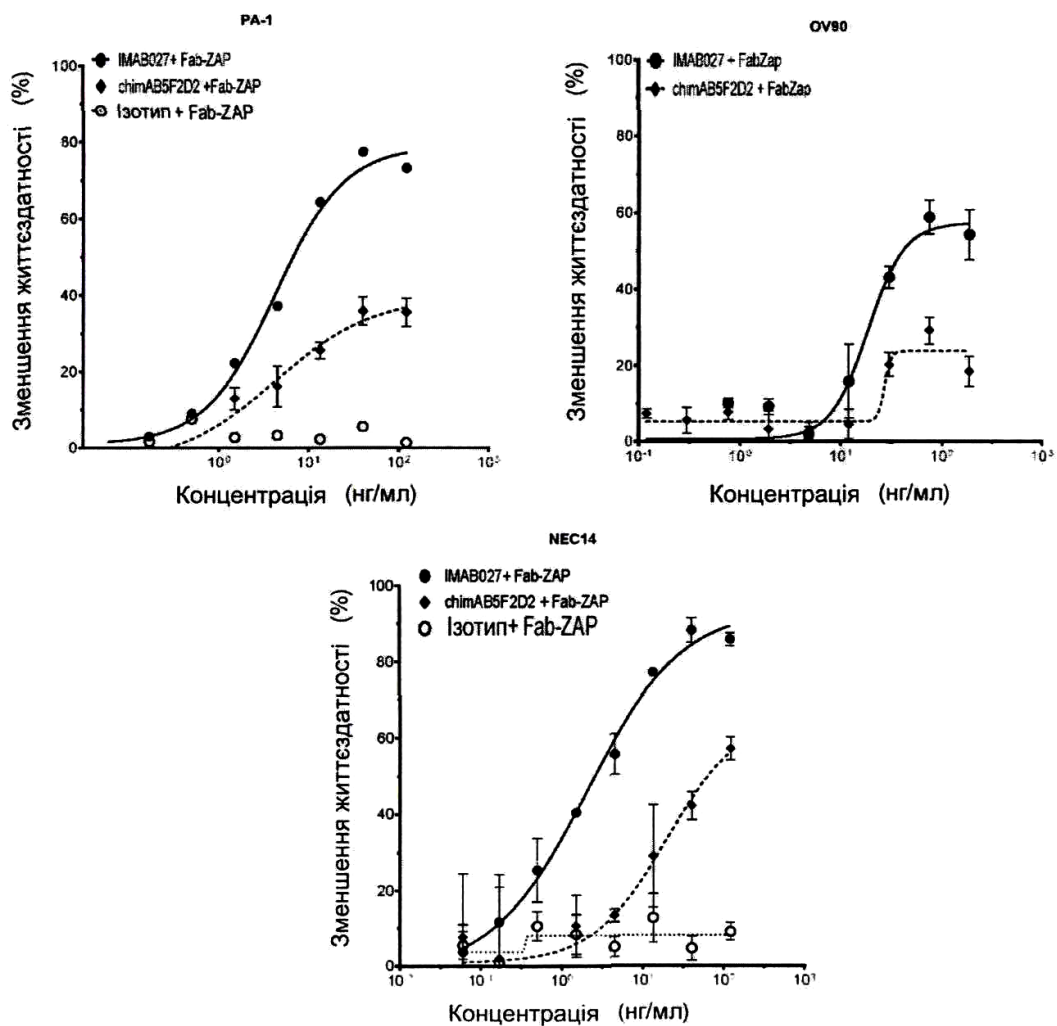
Фіг. 21



(B) Розріджувач



Фіг. 22



Фіг. 23А

(В)

Назва	PA-1		OV90		NEC14	
	Відносне значення EC50	Відносний максимум	Відносне значення EC50	Відносний максимум	Відносне значення EC50	Відносний максимум
Зв'язування IMAB027	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ендоцитоз IMAB027	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Зв'язування chimAB5F2D2	92%	143%	69%	97%	80%	93%
Ендоцитоз chimAB5F2D2	102%	50%	237%	39%	980%	71%

Фіг. 23В