

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390921 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.27(22) Дата подачи заявки
2021.10.19(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011105383.0

(32) 2020.10.15

(33) CN

(86) PCT/CN2021/124698

(87) WO 2022/078523 2022.04.21

(71) Заявитель:

ШАНХАЙ МИРАКОДЖЕН ИНК.;
КЕЙМЕД БАЙОСАЕНСИЗ КО., ЛТД
(CN)

(72) Изобретатель:

Ху Чаохун, Ли Ху, Чэнь Бо, Сюй Ган,
Ван Ин (CN)

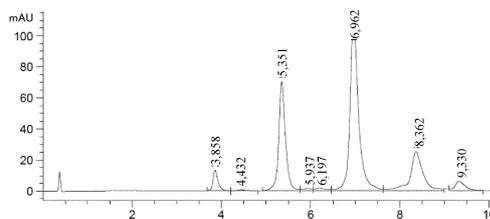
(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство и его применению и, в частности, предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемую соль и сольват или сольват соли. Конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную формулой I, где Ab представляет собой антитело к клаудину 18.2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по данному изобретению имеет хорошую активность, ингибирующую рост опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro*, низкую токсичность и хорошие перспективы в применении.

Ab-(L-D)_p

Формула I



A1

202390921

202390921

A1

PCT/CN2021/124698

МПК: *A61K 47/68* (2017.01) *C07K 16/30* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)*C07K 16/18* (2006.01)

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области медицинской химии, в частности, к конъюгатам антитело-лекарственное средство и их применениям.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

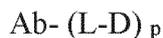
Рак желудка представляет собой один из самых распространенных видов рака в мире, с большей заболеваемостью в Восточной Азии, Западной Европе и Южной Америке и меньшей заболеваемостью в Северной Америке и Африке. Стандартным первоначальным лечением распространенного или рецидивирующего рака желудка является химиотерапия. Несмотря на то, что прогноз пациентов с раком желудка существенно улучшился благодаря развитию хирургических технологий и интраоперационного лечения, 5-летняя общая выживаемость составляет лишь 10-15%. Таргетная терапия принесла новые надежды на лечение рецидивирующего/распространенного рака желудка. Трастузумаб в составе комбинированной терапии может принести некоторую пользу положительным по HER2 пациентам, но только 15% пациентов имеют положительную экспрессию HER2, и популяция лиц, получающих пользу, ограничена. За последние годы иммунотерапия принесла новые надежды на лечение рецидивирующего/распространенного рака желудка; однако, согласно результатам исследования KEYNOTE-12, доля положительных по PD-L1 популяций, подходящих для данного лечения, составляет только 40% пациентов с рецидивирующим/распространенным раком желудка или аденокарциномой пищевода-желудочного перехода. Таким образом, разработка новых лекарственных средств для лечения рака желудка по-прежнему остается актуальной.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения получили конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства в результате серии экспериментов и изобретательской деятельности и подтвердили, что он обладает хорошей биологической активностью, тем

самым завершив данное изобретение.

Таким образом, в первом аспекте данного изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, и конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, показанную в Формуле I,



Формула I

где:

Ab представляет собой антитело к клаудину 18.2, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, и CDR1 (область, определяющая комплементарность) вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 68, 76, 84, 92, 100, 108 или 116, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 69, 77, 85, 93, 101, 109 или 117, или ее мутанта, и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 70, 78, 86, 94, 102, 110 или 118, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 50, 58, 124 или 132, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 51, 59, 125 или 133, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 52, 60, 126 или 134, или ее мутанта;

D представляет собой цитотоксическое средство.

L представляет собой линкер для связывания антитела к клаудину 18.2 и цитотоксического средства;

p представляет собой 2,0-8,0 (например, 2,0-7,0, 2,0-6,0, 2,0-5,0, 2,0-4,0, 3,0-7,0, 3,0-6,0, 3,0-5,0 или 3,0-4,0, или, например, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 или 7,0).

Конъюгат антитело-лекарственное средство по данному изобретению имеет хорошую ингибирующую рост опухолевых клеток активность как *in vivo*, так и *in vitro*, и хорошие перспективы в применении. Конъюгат антитело-лекарственное средство по данному изобретению образован путем соединения антитела к клаудину 18.2 и производного доластатина MMAE (монометилауристатин) посредством линкера MC-vc-

РАВ, и механизм его противоопухолевого действия является следующим. После присоединения к клаудину 18.2 на поверхности опухолевых клеток конъюгат антитело-лекарственное средство проникает в опухолевые клетки посредством эндоцитоза и транспортируется в лизосомы, а затем расщепляется протеазами в лизосомах с высвобождением ММАЕ. После проникновения в цитоплазму ММАЕ связывается с тубулином и ингибирует его полимеризацию, тем самым блокируя различные физиологические функции клеток, включая митоз с вовлечением тубулина, тем самым ингибируя пролиферацию опухолевых клеток и приводя к гибели опухолевых клеток.

Следует отметить, что «конъюгат антитело-лекарственное средство» представляет собой композицию, содержащую молекулы ADC (активного вещества) с одинаковыми или различными значениями DAR (отношение лекарственное средство-антитело). В частности, в данном изобретении предложены композиции, содержащие множество молекул ADC. В некоторых случаях каждый из множества ADC содержит одинаковое количество молекул лекарственного средства в композиции. В других случаях каждый из множества ADC содержит различное количество молекул лекарственного средства в композиции.

Отношение лекарственное средство-антитело (DAR) относится к количеству молекул лекарственного средства (например, в Формуле I), конъюгированных с антителом. Количество молекул лекарственного средства, содержащихся в конъюгате антитело-лекарственное средство по данному изобретению (например, p в Формуле I), обычно является целым числом. Когда количество молекул лекарственного средства, содержащихся в конъюгате антитело-лекарственное средство по данному изобретению (например, p в Формуле I), представляет собой дробное число, оно относится к среднему количеству конъюгированных молекул лекарственного средства на антитело в композиции, содержащей множество молекул ADC.

Вышеупомянутые отношения лекарственное средство-антитело (DAR) можно подтверждать стандартными способами, такими как масс-спектрометрия, исследования ELISA, HIC и HPLC. Также можно установить количественное распределение ADC по параметру p . В некоторых случаях разделение, очистка и валидация гомогенного ADC, для которых p представляет собой некоторое значение, от ADC с другими лекарственными средствами, можно осуществлять такими способами, как обращенно-фазовая HPLC или электрофорез.

В некоторых воплощениях CDR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к

клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34 или 42, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35 или 43, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36 или 44, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 50 или 58, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 51 или 59, или ее мутанта, и CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 52 или 60, или ее мутанта.

В некоторых воплощениях CDR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 68, 76, 84, 92, 100, 108 или 116, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 69, 77, 85, 93, 101, 109 или 117, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 70, 78, 86, 94, 102, 110 или 118, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 124 или 132, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 125 или 133, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 126 или 134, или ее мутанта.

В некоторых воплощениях CDR1, CDR2, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
- (2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,
- (3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,
- (4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,
- (5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,
- (6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,
- (7) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,
- (8) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,

- (9) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,
- (10) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,
- (11) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,
- (12) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,
- (13) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118;

CDR1, CDR2, CDR3 варибельной области легкой цепи антитела к кладину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,
- (2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60,
- (3) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,
- (4) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134.

В некоторых воплощениях CDR1, CDR2, CDR3 варибельной области тяжелой
цепи антитела к кладину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
- (2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,
- (3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,
- (4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,
- (5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,
- (6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44;

CDR1, CDR2, CDR3 варибельной области легкой цепи антитела к кладину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,
- (2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60.

В некоторых воплощениях CDR1, CDR2, CDR3 варибельной области тяжелой
цепи антитела к кладину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,
- (2) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,
- (9) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,
- (4) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,
- (5) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,
- (6) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,
- (7) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118;

CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи антитела к кладину 18.2

выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,

(2) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134.

В некоторых воплощениях FR1 (каркасный участок) вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 71, 79, 87, 95, 103, 111 или 119, или ее мутанта, FR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 72, 80, 88, 96, 104, 112 или 120, или ее мутанта, FR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 73, 81, 89, 97, 105, 113 или 121, или ее мутанта, FR4 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 74, 82, 90, 98, 106, 114 или 122, или ее мутанта, FR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 53, 61, 127 или 135, или ее мутанта, FR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 54, 62, 128 или 136, или ее мутанта, FR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 55, 63, 129 или 137, или ее мутанта; и FR4 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 56, 64, 130 или 138, или ее мутанта.

В некоторых воплощениях FR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37 или 45, или ее мутанта, FR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38 или 46, или ее мутанта, FR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39 или 47, или ее мутанта, FR4 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40 или 48, или ее мутанта, FR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 53 или 61, или ее мутанта, FR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 54 или 62, или ее мутанта, FR3

вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 55 или 63, или ее мутанта, и FR4 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 56 или 64, или ее мутанта.

В некоторых воплощениях FR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 71, 79, 87, 95, 103, 111 или 119, или ее мутанта, FR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 72, 80, 88, 96, 104, 112 или 120, или ее мутанта, FR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 73, 81, 89, 97, 105, 113 или 121, или ее мутанта, FR4 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности с SEQ ID NO: 74, 82, 90, 98, 106, 114 или 122, или ее мутанта, FR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 127 или 135, или ее мутанта, FR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 128 или 136, или ее мутанта, FR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 129 или 137, или ее мутанта, и FR4 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 130 или 138, или ее мутанта.

В некоторых воплощениях FR1, FR2, FR3, FR4 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,
- (2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,
- (3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
- (4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
- (5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,
- (6) SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48,
- (7) SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74,
- (8) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,
- (9) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,
- (10) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,
- (11) SEQ ID NO 103, SEQ ID NO 104, SEQ ID NO 105, SEQ ID NO 106,
- (12) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,

(13) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122;

FR1, FR2, FR3 и FR4 вариательной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,

(2) SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64,

(3) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,

(4) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138.

В некоторых воплощениях FR1, FR2, FR3, FR4 вариательной области тяжелой
цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,

(2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,

(3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,

(4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,

(5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,

(6) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48;

FR1, FR2, FR3 и FR4 вариательной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,

(2) SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64.

В некоторых воплощениях FR1, FR2, FR3, FR4 вариательной области тяжелой
цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74,

(2) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,

(3) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,

(4) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,

(5) SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,

(6) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,

(7) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122;

FR1, FR2, FR3 и FR4 вариательной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,

(2) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138.

В некоторых воплощениях вариательная область тяжелой цепи антитела к

клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 67, 75, 83, 91, 99, 107 или 115;

вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 49, 57, 123 или 131.

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33 или 41;

вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 49 или 57.

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 67, 75, 83, 91, 99, 107 или 115;

вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из последовательности с SEQ ID NO: 123 или 131.

В некоторых воплощениях вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 57,
- (2) SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 49,
- (3) SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 57,
- (4) SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 131.

В некоторых воплощениях последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2 представляют собой SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 49, соответственно.

В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из константных областей человеческого IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgM, IgA, IgD, IgA или мутанта указанных выше константных областей, предпочтительно, человеческого IgG1;

константная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из человеческой константной области лямбда, константной области каппа или мутанта указанных выше константных областей, предпочтительно, человеческой константной области каппа.

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность SEQ ID NO: 65, или

последовательность, имеющую идентичность более 70%, такую как более 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% с SEQ ID NO: 65;

аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность SEQ ID NO: 66, или последовательность, имеющую идентичность более 70%, такую как более 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% с SEQ ID NO: 66.

В некоторых воплощениях *r* представляет собой 3,0-4,0.

В некоторых воплощениях *r* представляет собой 3,0-3,8.

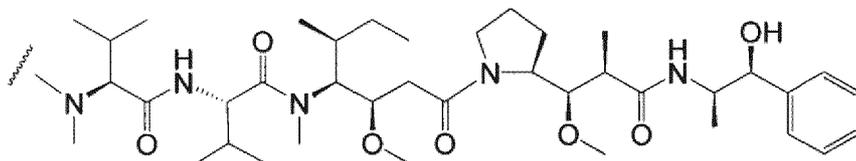
В некоторых воплощениях *r* представляет собой 3,0, 3,4, 3,5 или 3,8.

В некоторых воплощениях *r* представляет собой 3,8.

В некоторых воплощениях цитотоксический агент выбран из группы, состоящей из SN-38, гемцитабина, монOMETИЛАУРИСТАТИНА E (ММАЕ), монOMETИЛАУРИСТАТИНА F (ММАF), мейтанзиноидов (например, мейтанзина DM1, мейтанзина DM4), калихеамицина, МGBA (например, дуокармицина), доксорубицина, рицина, дифтерийного токсина и других токсинов, I131, интерлейкинов, фактора некроза опухоли, хемокинов и наночастиц.

В некоторых воплощениях цитотоксический агент представляет собой ММАЕ.

Структура ММАЕ является следующей:



В некоторых воплощениях линкер выбран из группы, состоящей из 6-малеимидогексаноила (МС), малеимидопропионила (МР), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерата (SPP), 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-формил (МСС), N-сукцинимидил(4-иодо-ацетил)аминобензоата (SIAB) и 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-*para*-аминобензилоксикарбонила (МС-vc-РАВ).

В некоторых воплощениях линкер представляет собой 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-*para*-аминобензилоксикарбонил (МС-vc-РАВ).

В некоторых воплощениях L-D, как описано в Формуле I, представляет собой МС-vc-РАВ-ММАЕ, и его структура приведена в следующей формуле:

(Arnold New)), 5-фторурацил плюс лейковорин, иринотекан (камптозар), оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, эстрамустин, митоксантрон (Новантрон), преднизолон, винкристин (Онковин), доксорубицин, преднизолон и так далее или их комбинацию.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит известное иммунотерапевтическое лекарственное средство для лечения опухолей, например, моноклональное антитело к PD-1 (такое как пембролизумаб, ниволумаб и так далее), моноклональное антитело к PD-L1 (такое как Атезолизумаб), моноклональное антитело к TIGIT, моноклональное антитело к 4-1BB, моноклональное ан к VEGFR2 (такое как Рамуцирумаб, апатиниб), моноклональное антитело к HER2 (такое как трастузумаб, биоаналог трастузумаба, Трастузумаб-dkst) и так далее или их комбинацию.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит иммуносупрессор, выбранный из: (1) глюкокортикоидов, таких как кортизон и преднизолон; (2) метаболитов микроорганизмов, таких как циклоспорин и такролимус и так далее; (3) антиметаболитов, таких как азатиоприн и 6-меркаптопурин и так далее; (4) поликлональных и моноклональных анти-лимфоцитарных антител, таких как антилимфоцитарный глобулин и ОКТ3 и так далее; (5) алкилирующих агентов, таких как циклофосфамид. В частности, иммуносупрессоры представляют собой, например, метилпреднизолон, преднизолон, азатиоприн, програф, ксенипра, суле, циклоспорин, такролимус, рапамицин, микофенолят мофетил, мизорибин, циклофосфамид, финголимод и так далее.

В некоторых воплощениях композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

В третьем аспекте данного изобретения предложено применение вышеупомянутого конъюгата антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или сольвата указанной соли или вышеупомянутой композиции в изготовлении лекарственных средств, указанные лекарственные средства применяются для профилактики и/или лечения заболевания, связанного с клаудином 18.2.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак поджелудочной железы.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

В четвертом аспекте данного изобретения предложены способы для профилактики и/или лечения заболевания, связанного с клаудином 12, включающие введение нуждающемуся субъекту профилактически и/или терапевтически эффективного количества вышеупомянутого конъюгата антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или сольвата указанной соли или вышеупомянутой композиции.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак поджелудочной железы.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

В пятом аспекте данного изобретения предложен вышеупомянутый конъюгат антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли или вышеупомянутая композиция, которые применяют для профилактики и/или лечения заболевания, связанного с клаудином 18.2.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак поджелудочной железы.

В некоторых воплощениях заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показана ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) из Примера по данному изобретению, демонстрирующая, что линия стабильно трансфицированных клеток НЕК293 экспрессирует клаудин 18.1 и клаудин 18.2, соответственно; линия стабильно трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующих клаудин 18.2, и контрольные клетки КАТО III способны к амплификации характерной полосы 780 пн (пар нуклеотидов), специфической для клаудина 18.2, тогда как клетки НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.1, способны к амплификации только общего фрагмента 504 пн.

На Фиг. 2 показаны результаты скрининга линии стабильно трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2, посредством FACS (метод анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией) в Примере данного изобретения, где черные точки представляют собой отрицательные контроли, а

серые точки представляют собой линии стабильно трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2.

На Фиг. 3 показаны результаты скрининга линии стабильно трансфицированных клеток НИЗТЗ, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2, посредством FACS в Примере данного изобретения, где черная линия представляет собой отрицательный контроль, а серая тень представляет собой линии стабильно трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2; NO.32-Н представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток ЗТЗ, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2, NO.18-М представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток ЗТЗ, экспрессирующих средние уровни клаудина 18.2, и NO.6-L представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток ЗТЗ, экспрессирующих низкие уровни клаудина 18.2.

На Фиг. 4 представлен график, демонстрирующий результаты ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) эффекта антитела к клаудину 18.2 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 5 представлен график, демонстрирующий результаты CDC (комплементзависимая цитотоксичность) эффекта антитела к клаудину 18.2 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 6 представлена хроматограмма гидрофобных взаимодействий (НЦ) конъюгата антитело-лекарственное средство из Примера данного изобретения.

На Фиг. 7 представлен график, демонстрирующий результаты цитолитического эффекта в отношении линии клеток LT-M11 различных ADC CM311 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 8 представлен график, демонстрирующий результаты ингибирующей активности CM311-ADC-1 и контрольного CM311-ADC-2 на опухолевый рост на модели рака желудка человека у бестимусных мышей с полученным у пациента ксенотрансплантатом (PDX) STO#025 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 9 представлен график, демонстрирующий влияние CM311-ADC-1 и контрольного CM311-ADC-2 на массу тела животных на модели рака желудка человека PDX у бестимусных мышей STO#025 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 10 представлен график, демонстрирующий результаты ингибирующей активности CM311-ADC-1 и контрольного CM311-ADC-2 на опухолевый рост на модели рака желудка человека PDX у бестимусных мышей STO#523 из Примера данного

изобретения.

На Фиг. 11 представлен график, демонстрирующий влияние CM311-ADC-1 и контрольного CM311-ADC-2 на массу тела животных на модели рака желудка человека PDX у бестимусных мышей STO#523 из Примера данного изобретения.

На Фиг. 12 представлен график, где сравнивают результаты активности конъюгата антитело-лекарственное средство из Примера данного изобретения и антитела в отношении клеток *in vitro* (график построен путем аппроксимации логарифмически преобразованной независимой переменной QC).

СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее воплощения данного изобретения будут описаны более подробно с отсылкой к приведенным ниже примерам, и специалистам в области техники понятно, что приведенные ниже примеры служат только для иллюстрации изобретения и не должны считаться ограничивающими объем данного изобретения. В тех случаях, когда в Примерах не указаны особые условия, их осуществляли в соответствии со стандартными условиями или условиями, рекомендованными производителем. Использувавшиеся реагенты или устройства, у которых изготовитель не указан, представляют собой стандартные продукты, которые доступны для приобретения.

В данном изобретении, если не указано иное, все научные и технические термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области техники. Кроме того, термины, относящиеся к химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, культуре клеток и тканей, микробиологии, иммунологии и используемым здесь лабораторным методам, представляют собой термины и рутинные процедуры, широко используемые в соответствующих областях. При этом, для лучшего понимания данного изобретения ниже приведены определения и трактовка соответствующих терминов.

Белок клаудин представляет собой скелетный белок, образующий структуру плотных контактов. Он располагается в верхней части граничащих межклеточных пространств. Его распределение является ткане- и органоспецифическим. Его основными функциями являются межклеточная адгезия, поддержание полярности клеток, регуляция параклеточной проницаемости и участие в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. В опухолях плотные контакты между клетками разрушаются, и клаудин не может осуществлять свою нормальную функцию.

Клаудин 18 является представителем семейства клаудина с 2 разными первыми экзонами, благодаря чему в результате альтернативного сплайсинга могут образовываться две изоформы: Клаудин 18.1 и клаудин 18.2. Эти две изоформы транскрибируются и амплифицируются в разных тканях, соответственно, из них клаудин 18.1 в основном экспрессируется в ткани легких, тогда как клаудин 18.2 специфически экспрессируется в ткани желудка. Клаудин 18.2 (идентификационный номер в Genbank: NM_001002026.3) не экспрессируется в нормальных тканях, кроме слизистой желудка, но его экспрессия существенно повышается при различных опухолях, включая 80% желудочно-кишечных аденом, 60% опухолей поджелудочной железы и некоторые опухоли желчных протоков, яичников и легких.

Термин «заболевание, связанное с клаудином 18.2» относится к заболеванию, при котором экспрессия клаудина 18.2 в клетках тканей отличается от нормальных уровней (например, превышает). Например, если уровень экспрессии клаудина 18.2 в клетках некоторых тканей выше, чем уровень экспрессии клаудина 18.2 в референсных или контрольных (то есть в клетках нормальной ткани), это указывает на наличие заболеваний, связанных с клаудином 18.2 у объекта (особенно, человека), от которого взяты клетки ткани.

В данном изобретении, если не указано иное, любой численный интервал следует понимать включающим любое значение или любой под-диапазон внутри диапазона.

В данном изобретении термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (L) цепь и одну «тяжелую» (H) цепь. Легкие цепи антител можно подразделить на две категории: каппа и лямбда. Тяжелые цепи можно подразделить на пять типов: μ , δ , γ , α или ϵ , и антитела можно подразделить на пять типов: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE в соответствии с различиями в тяжелых цепях. В составе легкой цепи и тяжелой цепи переменные и константные области соединены «J» сегментом длиной приблизительно 12 аминокислот или более, а тяжелые цепи дополнительно содержат «D» сегмент приблизительно из 3 аминокислот или более. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L . Константные области антител могут опосредовать связывание

иммуноглобулинов с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компонент C1q системы комплемента. Области V_H и V_L можно также подразделить на области с высокой вариабельностью, обозначаемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, обозначаемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 в направлении от аминоконца к карбокси-концу. Две вариабельные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая/легкая цепь, соответственно, образуют антигенсвязывающий сайт. Отнесение аминокислот к соответствующим областям или структурным доменам производится в соответствии с определениями по Kabat, приведенными в публикации *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:878-883.

В данном изобретении алгоритмы для определения идентичности (гомологии) последовательностей и процента сходства последовательностей представляют собой, например, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, соответственно, описанные в Altschul et al. (1977) *Nucl. Acid. Res.* 25:3389- 3402 и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. BLAST и BLAST 2.0 могут применяться для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей по данному изобретению с применением, например, описанных в литературе параметров или параметров по умолчанию. Программы для осуществления анализа BLAST предоставляются в открытый доступ Национальным центром биотехнологической информации.

В данном изобретении аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 70% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью, включают полипептидную последовательность, которая по существу идентична аминокислотной последовательности, например, такие, которые имеют идентичность по меньшей мере 70%, предпочтительно идентичность по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более по сравнению с полипептидной последовательностью по изобретению, при применении описанных здесь способов (например, анализ BLAST с применением стандартных параметров).

В данном изобретении мутант аминокислотной последовательности относится к

последовательности, имеющей идентичность более 70%, такой как более 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% с аминокислотной последовательностью, например, последовательностям с 3, 2 или 1 заменой, делецией или добавлением аминокислот. Предпочтительно, не более 3 аминокислот замещены, добавлены или удалены. Более предпочтительно, не более 2 аминокислот замещены, добавлены или удалены. Наиболее предпочтительно, не более 1 аминокислоты замещено, добавлено или удалено.

Вариант «с заменой» представляет собой вариант, в котором по меньшей мере один аминокислотный остаток нативной аминокислотной последовательности удален и в это же положение встроены другой аминокислотный остаток. Замены могут быть единичными, когда в молекуле замещается только одна аминокислота, или множественными, когда та же молекула имеет две или больше замещенных аминокислот. Множественные замены могут быть осуществлены в следующих друг за другом сайтах. Аналогично, одна аминокислота может быть замещена множеством остатков, при этом такие варианты включают и замены, и вставки. Вариант «со вставкой» (или с «добавлением») представляет собой вариант, в котором одна или более аминокислот вставлены в конкретном положении непосредственно после нативной последовательности. Непосредственно после аминокислоты означает присоединение к функциональной альфа-карбоксильной или альфа-аминогруппе аминокислоты. Вариант «с делецией» представляет собой вариант, в котором одна или более аминокислот в нативной аминокислотной последовательности были удалены. Как правило, варианты с делецией имеют одну или две аминокислоты, удаленные в определенной области их молекулы.

В некоторых воплощениях с антителом в реакции конъюгации конъюгируется меньше теоретического максимального количества лекарственной группировки. В целом, антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые присоединяют лекарственные группировки; фактически, большинство тиоловых групп цистеина в антителах существует в виде дисульфидных мостиков. В некоторых воплощениях антитело может быть восстановлено при помощи восстанавливающего агента, такого как дитиотрейтол (ДТТ) или трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР) в частично или полностью восстанавливающих условиях с образованием реакционноспособных тиоловых групп цистеина.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль представляет

собой неорганическую соль кислоты или органическую соль кислоты, где неорганическая соль кислоты представляет собой гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, нитрат, бикарбонат, карбонат, сульфат или фосфат, органическая соль кислоты представляет собой формиат, ацетат, пропионат, бензоат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, цитрат, аскорбат, α -кетоглутарат, α -глицерофосфат, алкилсульфонат или арилсульфонат; предпочтительно, алкилсульфонат представляет собой метансульфонат или этансульфонат; арилсульфонат представляет собой бензолсульфонат или *p*-толуолсульфонат.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены с применением стандартных процедур, хорошо известных в области техники, например, путем достижения достаточного количества основного соединения с подходящей кислотой, что дает фармацевтически приемлемый анион.

В данном описании, если не указано иное, термин «пролекарство» относится к производному, которое может быть гидролизовано, окислено или иным образом прореагировано в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) с получением соединения по данному изобретению. Пролекарства могут подвергаться такой реакции только в биологических условиях, становясь активными соединениями или они являются неактивными в непрореагировавшей форме. Пролекарства могут быть получены с применением хорошо известных способов, таких как описанные в *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff, ed., 5th ed.).

В данном изобретении сольваты относятся к таким формам конъюгатов антитело-лекарственное средство по данному изобретению: комплексы в твердой или жидкой форме, образованные путем координации конъюгатов антитело-лекарственное средство с молекулами растворителя. Гидраты представляют собой специфическую форму сольватов, которые имеют молекулы координационной воды. В данном изобретении гидраты являются предпочтительными сольватами.

Способы получения различных фармацевтических композиций, содержащие количества активных ингредиентов, известны или будут очевидны специалистам в области техники в свете данного изложения. Как описано в *REMYN'TON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES*, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995), способы получения таких фармацевтических композиций включают объединение подходящих фармацевтических эксципиентов, носителей, разбавителей и так далее, которые являются нетоксичными для клеток или млекопитающих, когда они

подвергаются воздействию применяемых доз и концентраций.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может содержать забуференный водный раствор; в альтернативном варианте может содержать буферы, такие как фосфатный, цитратный и содержащие другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу или декстрин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахароспирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWENTM, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICSTM.

Фармацевтические составы по данному изобретению изготавливают известными способами, включая стандартные способы смешивания, растворения или лиофилизации. Соединения по данному изобретению можно составлять в фармацевтические композиции и вводить пациентам различными путями, подходящими для выбранного способа введения, например, перорально или парентерально (через внутривенный, внутримышечный, местный или подкожный пути).

Таким образом, соединения по данному изобретению в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем (например, инертным разбавителем или усваиваемым и съедобным носителем) можно вводить системно, например, перорально. Их можно заключать в твердые или мягкие желатиновые капсулы, которые можно прессовать в таблетки. Для перорального введения активное соединение можно соединять с одним или более эксципиентами и представлять в форме проглатываемых таблеток, защечных таблеток, леденцов, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и тому подобного. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% активного соединения. Пропорции таких композиций и составов несомненно могут варьировать от приблизительно 1% до приблизительно 99% по массе заданной дозированной лекарственной формы. В таких композициях для терапевтического применения активное соединение находится в таком количестве, что может достигаться эффективный уровень дозировки.

Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и так далее могут также содержать

связывающие вещества, такие как трагакант, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; эксципиенты, такие как двузамещенный фосфат кальция; разрыхлители, такие как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и так далее; смазывающие вещества, такие как стеарат магния, и подсластители, такие как сахароза, фруктоза, лактоза или аспартам; или корригенты, такие как перечная мята, масло грушанки или корригент вишня. Когда дозированная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как растительное масло или полиэтиленгликоль. Могут присутствовать различные материалы, такие как оболочки, или физическая форма твердой дозированной лекарственной формы может быть изменена иным образом. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут иметь оболочку из желатина, воска, шеллака или сахара и тому подобного. Сироп или эликсир может содержать активные компоненты, сахарозу или фруктозу в качестве подсластителя, метил- или пропилпарабен в качестве консерванта, краситель и корригент (такой как корригент вишня или корригент апельсин). Несомненно, любые материалы, используемые в изготовлении любой дозированной лекарственной формы, должны быть фармацевтически приемлемыми и по существу нетоксичными в используемых количествах. Кроме того, активные соединения можно включать в составы с пролонгированным высвобождением и устройства для пролонгированного высвобождения.

Активные соединения также можно вводить внутривенно или внутривенно путем инфузии или инъекции. Можно получать водные растворы активных соединений или их солей, возможно, путем смешивания с нетоксичными поверхностно-активными веществами. Для получения дисперсий также можно применять глицерин, жидкие полиэтиленгликоли, триацетин и их смеси, а также масла. В обычных условиях хранения и применения данные препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для инъекций или инфузий, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии или стерильный порошок, содержащий активный ингредиент (возможно, инкапсулированный в липосомы), подходящий для приготовления непосредственно перед применением стерильных растворов или дисперсий для инъекций или инфузий. Во всех случаях готовая лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Жидкий носитель может представлять собой растворитель или

диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное), растительные масла, нетоксичные глицериды или их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно, например, поддерживать путем формирования липосом, поддерживать необходимый размер частиц в случае дисперсий или применять поверхностно-активные вещества. Предотвратить воздействие микроорганизмов можно при помощи различных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота, мертиолят и тому подобные. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические агенты, такие как сахара, буферы или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута благодаря применению средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активных соединений в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрования. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и высушивание из замороженного состояния, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент, ранее находящийся в простерилизованных фильтрованием растворах.

Полезные твердые носители включают растертые в порошок твердые вещества (например, тальк, глину, микрокристаллическую целлюлозу, диоксид кремния, оксид алюминия и тому подобное). Полезные жидкие носители включают воду, этанол или этиленгликоль или смеси вода-этанол/этиленгликоль, в которых соединения по данному изобретению могут быть растворены или диспергированы в эффективном количестве, возможно, с помощью неионных поверхностно-активных веществ. Адьюванты (например, корригенты) и дополнительные противомикробные агенты могут быть добавлены для оптимизации свойств для заданного применения.

Загустители (такие как синтетические полимеры, жирные кислоты, соли и эфиры жирных кислот, жирные спирты, модифицированные целлюлозы или модифицированные неорганические материалы) также можно применять с жидкими носителями для образования пластичных паст, гелей, мазей, мыл и так далее, которые

можно наносить непосредственно на кожу пациента).

Вышеупомянутые составы могут быть представлены в виде дозированной лекарственной формы, которая представляет собой физически дискретные единицы, содержащие однократные дозы, подходящие для введения в организм человека и других млекопитающих. Дозированная лекарственная форма может представлять собой капсулу или таблетку или ряд капсул или таблеток. В зависимости от конкретного способа лечения количество активного ингредиента в разовой дозе может варьировать или корректироваться от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг или более.

Кроме того, сюда также входит применение различных новых лекарственных форм, таких как лакто-липосомы, микросферы и наносферы, такое как применение дисперсных систем на основе микрочастиц, включающих полимерные мицеллы, наноэмульсии, субмикрoэмульсии, микрокапсулы, микросферы, липосомы и нисомы (также известные как везикулы неионных поверхностно-активных веществ).

Используемый в данном документе термин «лечение» обычно относится к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим, если говорить о полном или частичном предупреждении заболевания или его симптомов; и/или терапевтическим, если говорить о частичной или полной стабилизации или излечении заболевания и/или побочных эффектов вследствие заболевания. «Лечение» в данном документе охватывает любое лечение заболевания пациента, включая: (а) предупреждение заболевания или симптомов у пациента, подверженного заболеванию или состоянию, но еще не диагностированного; (б) подавление симптомов заболевания, то есть предупреждение их развития; или (в) облегчение симптомов заболевания, то есть обратное развитие заболевания или симптомов.

В данном изобретении «субъект» относятся к позвоночному. В некоторых воплощениях позвоночное относится к млекопитающему. Млекопитающие включают одомашненных животных (таких как домашний скот), домашних животных (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс, без ограничения. В некоторых воплощениях млекопитающее относится к человеку.

В данном изобретении «эффективное количество» относится к количеству, эффективному для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта при необходимой дозе за необходимое время. «Терапевтически эффективное количество» вещества/молекулы по данному изобретению может варьировать в

зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума, а также от способности вещества/молекулы вызывать у индивидуума желаемый ответ. Терапевтически эффективное количество также охватывает количество, при котором любые токсические или негативные последствия вещества/молекулы перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному для достижения желаемого профилактического эффекта при необходимой дозе за необходимое время. Как правило, но не обязательно, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество, поскольку профилактическую дозу вводят субъекту до развития заболевания или на ранней стадии развития заболевания. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства уменьшает количество раковых клеток; уменьшает размер опухоли; подавляет (то есть замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) инфильтрацию окружающих органов раковыми клетками, подавляет (то есть замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) метастазирование опухоли, подавляет рост опухоли до некоторой степени и/или облегчает до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком.

В данном изобретении 20 стандартных аминокислот и их сокращенные обозначения являются общепринятыми. См. *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub и D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), содержание данного документа включено в данное описание путем ссылки.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, у которого последовательности переменных областей происходят из одних биологических видов, а последовательности константных областей происходят из других биологических видов, таким как антитела, у которых последовательности переменных областей происходят из мышинового антитела, а последовательности константных областей происходят из человеческого антитела.

«Гуманизированные» антитела относятся к формам антител, не являющимся человеческими (например, мышинным), которые представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие последовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулинов, не являющихся человеческими. Предпочтительно, гуманизированное антитело

представляет собой человеческий иммуноглобулин (антитело-реципиент), в котором остатки, определяющие комплементарность (CDR), антитела-реципиента заменены на CDR-остатки антител биологических видов, отличных от человека (антитело-донор), таких как мышь, крыса или кролик, обладающие необходимой специфичностью, аффинностью и активностью.

Кроме того, при гуманизации также возможно мутировать аминокислотные остатки в составе CDR1, CDR2 и/или CDR3 областей VH и/или VL, тем самым улучшая одно или более связывающих свойств (например, аффинность) антитела. Например, опосредованный ПЦР мутагенез можно осуществлять для внедрения мутаций, чье влияние на связывание антитела или другие функциональные свойства можно оценивать при помощи *in vitro* или *in vivo* исследований, описанных в данном документе. Как правило, внедряют консервативные мутации. Такие мутации могут представлять собой замены, добавления или делеции аминокислот. Кроме того, в составе CDR обычно бывает не более одной или двух мутаций. Соответственно, гуманизированные антитела по данному изобретению также охватывают антитела, содержащие 1 или 2 аминокислотные мутации в составе CDR.

Далее данное изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах, однако эти примеры не ограничивают объем данного изобретения.

Пример 1. Получение гуманизированного антитела

1. Получение моноклонального антитела к клаудину 18.2

Для иммунизации мышей Balb/c и скрининга одновременно применяли множество стратегий с получением моноклональных антител, специфически связывающихся не только с клаудином 18.2, но и с клаудином 18.1, иным сплайс-вариантом клаудина 18, следующим образом:

1) Конструирование стабильно трансфицированных линий клеток, экспрессирующих клаудин 18.2

Синтезировали плазмиду клаудин 18.1-puc57-Amp (SynbioTech), содержащую ген полноразмерной последовательности человеческого клаудина 18.1 (UniProtKB-P56856). Используя указанную плазмиду в качестве матрицы, амплифицировали полноразмерный фрагмент человеческого клаудина 18.1 (Met1-Val261) при помощи ПЦР с прямым праймером 5'-ttggcaaagaattgctagatgtccaccaccatgcc-3' (SEQ ID NO: 171) и обратным праймером 5'-tgttcgggcccctcctcgattacacatagctgtgcttgg-3' (SEQ ID NO: 172). Амплифицированный продукт ферментативно лигировали с применением общей

реакционной смеси NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB, кат. номер: M0530L) и затем клонировали в плазмиду для экспрессии в клетках эукариот. Аналогично, синтезировали плазмиду клаудин 18.2-puc57-Amp (SynbioTech), содержащую ген полноразмерной последовательности человеческого клаудина 18.2 (UniProtKB-P56856-2). Используя указанную плазмиду в качестве матрицы, амплифицировали полноразмерный фрагмент человеческого клаудина 18.2 (Met1-Val261) при помощи ПЦР с прямым праймером 5'-ttggcaagaattgctagatggccgtgactgcctgtc-3' (SEQ ID NO: 173) и обратным праймером 5'-tgttcgggccctcctcgattacacatagctgtgcttgg-3' (SEQ ID NO: 174). Амплифицированный продукт ферментативно лигировали с применением общей реакционной смеси NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB, кат. номер: M0530L) и затем клонировали в плазмиду для экспрессии в клетках эукариот. Указанную плазмиду вводили путем электропорации в клетки NIH3T3 и HEK293, соответственно, и использовали 1-10 мкг/мл пурамицина (Gibco, кат. номер: A1113803) для поэтапного скрининга под давлением для получения клеточных линий со стабильной экспрессией.

Полученные стабильно трансфицированные клеточные линии HEK293, экспрессирующие клаудин 18.1 и стабильно трансфицированные клеточные линии HEK293, экспрессирующие клаудин 18.2, вначале верифицировали методом ОТ-ПЦР. Выделяли общую РНК из положительных клонов клеток при помощи набора Trizol для выделения РНК и набора для обратной транскрипции (система синтеза первой цепи SuperScript™, кат. номер: 18080051) использовали для получения библиотеки кДНК посредством обратной транскрипции с праймерами Oligo (dT). Поскольку два сплайс-фрагмента клаудина, клаудин 18.1 и клаудин 18.2, различаются в области от N-конца до первого внеклеточного домена (Петля 1), сконструировали праймеры KNB14 (5'-tgtgcgccaccatggccgtg-3' (SEQ ID NO: 175)) и KNB15 (5'-tggaaggataagattgtacc-3' (SEQ ID NO: 176)), способные амплифицировать область (504 пн) от Петли 1 до C-конца (не включая петлю 1) клаудина 18.1 и клаудина 18.2; сконструировали праймер KNB16 (5'-tgggtgccattggcctcctg-3' (SEQ ID NO: 177), способный специфически и комплементарно связываться с N-концом клаудина 18.2, но не связываться с N-концом клаудина 18.1, и амплифицировали только полноразмерный фрагмент (780 пн) клаудина 18.2 от N-конца до C-конца и в качестве положительного контроля использовали клетки КАТО III (ATCC HTB-103), экспрессирующие клаудин 18.2. Как показано на Фиг. 1, ОТ-ПЦР демонстрирует, что стабильно трансфицированные клеточные линии HEK293 экспрессировали клаудин 18.1 и клаудин 18.2, соответственно. И линия стабильно

трансфицированных клеток НЕК293, экспрессирующих клаудин 18.2, и контрольные клетки КАТО III способны к амплификации характерной полосы 780 пн, специфической для клаудина 18.2, тогда как клетки НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.1, способны к амплификации только общего фрагмента 504 пн.

Стабильно трансфицированные клеточные линии НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.2, и клетки NIH3T3, экспрессирующие клаудин 18.2, расщепляли и собирали, двукратно промывали PBS и инкубировали со 100 мкл разведенного 1:200 первичного антитела кролика к клаудину 18.2 (Abcam, EPR19202, кат. номер: ab222512) при 4°C в течение 60 минут. Избыток раствора первичного антитела смывали при помощи 0,5% BSA/PBS и добавляли 50 мкл вторичного козьего антитела, специфичного к Fc-фрагменту IgG кролика, конъюгированного с AF647 (Jackson ImmunoResearch, кат: 111-606-046) и инкубировали при 4°C в течение 45 минут. Избыток вторичного антитела смывали 0,5% BSA/PBS и в конце ресуспендировали клетки в 100 мкл раствора PBS и немедленно детектировали при помощи проточной цитометрии. Результаты показаны на Фиг 2 и Фиг. 3.

На Фиг. 2 показаны результаты исследования методом FACS стабильно трансфицированных клеточных линий НЕК293-клаудин 18.2, трансфицированных геном полноразмерного клаудина 18.2. Черные точки представляют собой нетрансфицированные клетки НЕК293, а серые точки представляют стабильно трансфицированные клетки НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.2. Клетки НЕК293 не экспрессируют клаудин 18.2, а стабильно трансфицированные клетки НЕК293-Claudin 18.2 экспрессируют клаудин 18.2 на клеточной поверхности.

На Фиг. 3 показаны результаты определения клаудина 18.2 методом FACS в стабильно трансфицированных клеточных линиях NIH3T3, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2. Черная линия представляет собой отрицательный контроль, а серая штриховка представляет собой стабильно трансфицированную клеточную линию, экспрессирующую клаудин 18.2. NO.32-H представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток 3T3, экспрессирующих высокие уровни клаудина 18.2, NO.18-M представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток 3T3, экспрессирующих средние уровни клаудина 18.2, и NO. 6-L представляет собой линию стабильно трансфицированных клеток 3T3, экспрессирующих низкие уровни клаудина 18.2.

Собирали и замораживали размноженные положительные клетки стабильно

трансфицированных линий и для иммунизации животных использовали линию стабильно трансфицированных клеток NIH3T3, экспрессирующих клаудин 18.2.

2) Получение из гибридом моноклональных антител к клаудину 18.2

Мышей Balb/c в возрасте 6-8 недель иммунизировали клетками стабильно трансфицированной линии 3T3, экспрессирующими клаудин 18.2, или в качестве альтернативы плазмидой, кодирующей клаудин 18.2, соответственно. Когда для иммунизации применяли клетки, 1×10^6 стабильно трансфицированных клеток 3T3, экспрессирующих клаудин 18.2, каждый раз смешивали с адьювантом Фрейнда или адьювантом не-Фрейнда (non-Freund's adjuvant), затем осуществляли инъекцию в корень бедра и подушечки стопы и через две недели вновь осуществляли иммунизацию в разные места. Когда для иммунизации использовали ДНК, 20 мкг плазмиды смешивали с 1 мкг CpG и затем осуществляли инъекцию непосредственно в брюшную полость мыши с использованием генной пушки (Biorad) при 40 фунтов на квадратный дюйм и осуществляли иммунизацию один раз в неделю. За три дня до инфузии клетки стабильно трансфицированной линии HEK293, экспрессирующие высокие уровни клаудина 18.2, использовали для инъекции в хвостовую вену 1×10^6 клеток/50 мкл на мышь для импульсной иммунизации. Через три дня мышей умерщвляли и забирали подколенные, паховые и подвздошные лимфоузлы и растирали в DMEM с получением богатой В-клетками суспензии; удаляли селезенку мышей, растирали в DMEM и центрифугировали с получением суспензии клеток селезенки. Соответствующее количество смеси лимфоузлов и суспензии клеток селезенки смешивали с SP2/0 и сливали клетки с применением устройства для слияния методом электрошока.

3) Конструирование фаговой библиотеки антител к клаудину 18.2

Часть собранной суспензии селезенок мыши и клеток лимфоузлов использовали для выделения общей РНК при помощи набора Trizol для выделения РНК и осуществляли обратную транскрипцию с применением набора для обратной транскрипции (система синтеза первой цепи SuperScript™, кат. номер 18080051) с праймерами, специфическими для легкой и тяжелой цепей с получением библиотек кДНК легкой и тяжелой цепей, соответственно. Используя эту библиотеку кДНК в качестве матрицы, амплифицировали при помощи ПЦР фрагменты переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела с применением праймеров к переменным областям легкой и тяжелой цепей и после ферментативного расщепления клонировали продукты ПЦР в фаговый плазмидный вектор, содержащий константную область легкой

цепи Скаппа человеческого антитела или СН1 константной области тяжелой цепи человеческого IgG1, образующие химерные библиотеку легкой цепи и библиотеку тяжелой цепи, соответственно. Фрагменты антител в библиотеке легкой цепи расщепляли двумя ферментами BspQI и SfiI и затем лигировали в библиотеку тяжелой цепи с созданием библиотеки фагового дисплея мышинового химерного Fab на основе нитчатого фага M13, с емкостью библиотеки $1,2 \times 10^{10}$. Брали 0,8 мл фага (титр приблизительно 1×10^{13} /мл) и смешивали с 200 мкл 5% BSA/PBS, добавляли 1×10^7 клеток НЕК293, экспрессирующих клаудин 18.1, и помещали на ледяную баню на 1 час; после центрифугирования при 1000 об/мин в течение 10 минут собранную надосадочную жидкость смешивали с 1×10^6 клеток НЕК293, экспрессирующих клаудин 18.2, помещали на ледяную баню на 1 час, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут и отбрасывали надосадочную жидкость; добавляли 1 мл 1% BSA/PBS и повторно промывали 5-10 раз; добавляли 1 мл 100 мМ ТЕА для лизиса клеток, добавляли 0,5 мл 1 М Tris-HCl, pH 7,5 для нейтрализации после инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре и 10 мл TG1 *E. coli*. в логарифмической фазе роста использовали для инфицирования фагом при 37°C в течение 30 минут. Согласно рутинным процедурам молекулярной биологии фаги извлекали, определяли титр и выполняли следующий раунд пэннинга.

2. Скрининг и определение последовательности антител, специфических к клаудину 18.2

НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.1, НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.2, и клетки НЕК293 предварительно окрашивали 5 мкМ, 0,5 мкМ и 0 мкМ красителя Cell Tracker Green CMFDA (Thermo, кат. номер: C2925), соответственно, согласно инструкциям для окрашивания живых клеток. После отмывания красителя клетки смешивали в соотношении 1:1:1, добавляли в 96-луночные планшеты (2×10^5 клеток/лунку), объединяли с надосадочной жидкостью гибридомы или надосадочной жидкостью, полученной посредством бактериальной индукции, и инкубировали на ледяной бане в течение 1 часа. Добавляли меченное AlexaFluor647 вторичное антитело к Fc-фрагменту IgG мыши или к F(ab)'2-фрагменту IgG человека (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали на льду в течение 45 минут. После промывания в каждую лунку добавляли по 100 мкл PBS, чтобы ресуспендировать клетки, анализировали клетки при помощи проточного цитометра (iQue Screener), гейтировали три различных популяции клеток согласно различиям в интенсивности флуоресценции в канале FL2 и затем

определяли связывание исследуемого антитела с каждой популяцией клеток в канале FL4. Антитело, прошедшее скрининг, связывалось со стабильно трансфицированными клетками НЕК293, экспрессирующими клаудин 18.2, с высокой аффинностью и специфичностью и не связывалось со стабильно трансфицированными клетками НЕК293, экспрессирующими клаудин 18.1 или клетками НЕК293. Из клеток гибридомы всего осуществляли скрининг методом FACS для 320 клонов, и указанные 320 клонов были способны связываться с клаудином 18.2, но не с клаудином 18.1; после 3 раундов пэннинга отбирали 62 клон из фаговой библиотеки Fab и указанные 62 клон связывались с клаудином 18.2 с высокой аффинностью, но не с клаудином 18.1.

Из положительных клонов, прошедших скрининг из библиотеки фагового дисплея, выделяли плазмиды для секвенирования и клонировали последовательности переменных областей в векторы константных областей тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно, для экспрессии полноразмерного IgG. Положительные клетки, полученные из гибридом, лизировали путем добавления 1 мл TRNzol и выделяли общую РНК методом с тиоцианатом гуанидина. Используя ее в качестве матрицы, после синтеза первой цепи кДНК использовали первую цепь кДНК в качестве следующей матрицы для амплификации последовательности ДНК переменной области, соответствующей клеткам гибридомы. После секвенирования амплифицированных продуктов получали последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей гибридом-кандидатов, как показано ниже.

Клон 18D10:

Тяжелая цепь

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT GYSITSNYAWN WIRQFPGNKLEWMG
YINYSGNTNYNPSLKS RISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCAT SYYGNSFIY
 WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 139).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 140), CDR2 (SEQ ID NO: 141), CDR3 (SEQ ID NO: 142) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 143), FR2 (SEQ ID NO: 144), FR3 (SEQ ID NO: 145) и FR4 (SEQ ID NO: 146) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCT
 CTGTCCCTCACCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTAATTATGCCTGGAA
 CTGGATCCGACAGTTTCCAGGAAACAACTAGAGTGGATGGGCTACATAAACTA

CAGTGGGAACACTAACTATAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGA
GACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTGCTGAGGACA
CAGCCACATATTATTGTGCAACCTCCTATTATGGTAATTCCTTTATTTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 178).

Легкая цепь

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNAYSFPWTFGGGTKL
EIK (SEQ ID NO: 147).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 148), CDR2 (SEQ ID NO: 149), CDR3 (SEQ ID NO: 150) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 151), FR2 (SEQ ID NO: 152), FR3 (SEQ ID NO: 153) и FR4 (SEQ ID NO: 154) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAG
AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAA
AAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAGTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG
ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA
GTTTATTACTGTCAGAATGCTTATAGTTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAA
GCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 179).

Клон 18A9:

Тяжелая цепь

QVQLQQSGREVVRPGTSVKVSCKPSGYAFTNYLIDWVKQRPGQGLEWIGGIN
PGSGDTVYNEKFKAKATLTADKSSMTANMQLSSLTSDDSAVYFCARRVRGNSFDSW
GQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 155).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 156), CDR2 (SEQ ID NO: 157), CDR3 (SEQ ID NO: 158) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 159), FR2 (SEQ ID NO: 160), FR3 (SEQ ID NO: 161), FR4 (SEQ ID NO: 162) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACGTGAGGTGGTAAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGATACGCCTTCACTAATTACTTGATAGAC

TGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGGGATTAATCCT
 GGAAGTGGTGACACTGTGTACAATGAGAAGTTCAAGGCCAAGGCAACACTGACT
 GCAGACAAATCCTCCATGACTGCCAACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATG
 ACTCTGCGGTCTATTTCTGCGCAAGAAGGGTCCGTGGTAATTCGTTTGATTCTGG
 GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 180).

Легкая цепь

DIVMSQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKL
 LIYWASTRESGVDRFTGSGSGKDFLTISVQAEDLALYQCQNNYFYPLTFGAGTKL
 ELK (SEQ ID NO: 163).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 164), CDR2 (SEQ ID NO: 165), CDR3 (SEQ ID NO: 166) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 167), FR2 (SEQ ID NO: 168), FR3 (SEQ ID NO: 169) и FR4 (SEQ ID NO: 170) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAG
 AAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAA
 AAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAATTGTTGA
 TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG
 ATCTGGAAAAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA
 CTTTATTACTGTCAGAATAATTATTTTTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAA
 GCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 181).

Фрагменты последовательностей указанных выше переменных областей тяжелой и легкой цепи амплифицировали при помощи ПЦР и переменную область тяжелой цепи клонировали в вектор, содержащий константную область тяжелой цепи для экспрессии интактной тяжелой цепи IgG1 в клетках млекопитающих. Аналогично, переменную область легкой цепи клонировали в вектор, содержащий константную область легкой цепи для экспрессии полной легкой цепи каппа в клетках млекопитающих. После верификации последовательностей ими трансфицировали клетки млекопитающих HEK293-6E, IgG1 экспрессировался и секретировался в среду, и надосадочную жидкость собирали, фильтровали и затем очищали. IgG очищали при помощи хроматографии с белком А и культуральную надосадочную жидкость загружали в колонку соответствующего размера с белком А, промывали 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 250

мМ NaCl, и связавшийся IgG элюировали при помощи 0,1 М глицина-HCl, pH 3,0. Белок концентрировали путем ультрафильтрации с применением концентрирующей пробирки (Millipore), и определяли концентрацию IgG спектрофотометрически путем определения OD280. Чистоту IgG анализировали при помощи SDS-PAGE.

НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.1, НЕК293, экспрессирующие клаудин 18.2, и клетки НЕК293 собирали в логарифмической фазе роста, после их расщепления 5×10^4 клеток/100 мкл добавляли в круглодонный 96-луночный планшет, центрифугировали при 1100 об/мин в течение 3 минут, затем надосадочную жидкость отбрасывали. Клетки легко постукивали и в каждую лунку добавляли по 50 мкл последовательно разведенных антител (8 градиентов с 5-кратным разведением с начальной концентрацией антител 100 нМ) и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. После инкубации в каждую лунку добавляли по 140 мкл 0,5% BSA для 3-кратного промывания и добавляли 30 мкл/лунку вторичного антитела к человеческому IgG, конъюгированного с AlexaFluor647 (Jackson ImmunoResearch, кат: 109-606-170), и инкубировали при 4°C в течение 40 минут. После инкубации в каждую лунку добавляли по 140 мкл 0,5% BSA для 3-кратного промывания и, наконец, содержимое каждой лунки ресуспендировали в 50 мкл PBS для детекции при помощи проточной цитометрии (iQue Screener). Как показано в Таблице 1, результаты свидетельствуют, что полученное химерное антитело IgG1 к клаудину 18.2 распознает только клетки НЕК293, трансфицированные геном клаудина 18.2, экспрессирующие клаудин 18.2, но не связывается с НЕК293 или НЕК293, экспрессирующими клаудин 18.1.

Таблица 1: Связывание антител к клаудину 18.2 с клетками стабильно трансфицированных линий (N.B. указывает отсутствие детектируемого связывания)

mAb	Клаудин 18.2	Клаудин 18.1	НЕК293
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)
Клон 18D10	0,37	N.B.	N.B.
Клон 18A9	0,31	N.B.	N.B.

3. Гуманизация антитела к клаудину 18.2

Выбранные последовательности переменных областей моноклонального антитела выравнивали с последовательностями первичного человеческого антитела для определения последовательности с высокой гомологией для пересадки CDR; затем осуществляли компьютерное моделирование на основе гомологии для анализа области

CDR и окружающей ее каркасной аминокислотной последовательности для исследования ее пространственного трехмерного способа связывания. Путем расчета электростатических взаимодействий, сил ван-дер-Ваальса, гидрофобности и значения энтропии анализировали ключевые аминокислотные остатки в каждой последовательности гена положительного моноклонального антитела, которые могут взаимодействовать с мишенью и поддерживать пространственный каркас, и соответственным образом проектировали сайты обратных мутаций. Анализировали аффинность HLA-DR и выбирали каркасные последовательности первичного антитела человека с меньшей иммуногенностью. Анализировали аминокислотные остатки, которые могут быть модифицированы в ходе ферментации, и проектировали мутации для уменьшения вероятности модификации.

Конструировали различные производные тяжелой цепи и легкой цепи. После синтеза полной последовательности производных легкой и тяжелой цепей их клонировали в вектор, содержащий константную область Скаппа каппа-цепи антитела или CH1-CH3 константной области человеческого IgG1. После объединения парами плазмид, несущих производные легкой и тяжелой цепей, соответственно, происходящие от одного и того же родителя, трансфицировали клетки НЕК293.6Е для экспрессии антител в течение 5-6 дней и собирали надосадочную жидкость и очищали на колонке с белком А.

Последовательности гуманизированных антител были следующими:

18D10:

Вариабельная область тяжелой цепи:

18D10VHv1:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GYSITSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGNTNYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAT SYYGNSFIY
 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1);

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO:2), CDR2 (SEQ ID NO:3), CDR3 (SEQ ID NO:4) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 5), FR2 (SEQ ID NO: 6), FR3 (SEQ ID NO: 7) и FR4 (SEQ ID NO: 8) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCTACAGCATCACCAGCAACTACGCCTGG

AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCAACT
 ACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA
 GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
 ATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
 GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 182).

18D10VHv2:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWMG
YINYSGNTNYPSLKS RITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT SYYGNSFIY
 WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 9);

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11), CDR3 (SEQ ID NO: 12) слева направо, соответственно;

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 13), FR2 (SEQ ID NO: 14), FR3 (SEQ ID NO: 15) и FR4 (SEQ ID NO: 16) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
 AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATGGGCTACATCAACT
 ACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAATCACCATCAGCA
 GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
 ATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
 GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 183).

18D10VHv3:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWIRQPPGKGLEWIGYIN
YSGNTNYPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATSYYGNSFIYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 17).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 19), CDR3 (SEQ ID NO: 20) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 21), FR2 (SEQ ID NO: 22), FR3 (SEQ ID NO: 23) и FR4 (SEQ ID NO: 24) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
 AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCAACT

ACAGCGGCAACACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA
GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
ATACAGCCGTGTACTIONACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 184).

18D10VHv4:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGYTNYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT SYYGNSFIY
WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 25).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 27), CDR3 (SEQ ID NO: 28) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 29), FR2 (SEQ ID NO: 30), FR3 (SEQ ID NO: 31) и FR4 (SEQ ID NO: 32) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCAACT
ACAGCGGCTACACCAACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA
GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
ATACAGCCGTGTACTIONACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 185).

18D10VHv5:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YINYSGNTAYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAT SYYGNSFIY
WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 33).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO:34), CDR2 (SEQ ID NO:35), CDR3 (SEQ ID NO:36) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 37), FR2 (SEQ ID NO: 38), FR3 (SEQ ID NO: 39) и FR4 (SEQ ID NO: 40) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTCACTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCAACT
ACAGCGGCAACACCGCCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA

GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
 ATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
 GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 186).

18D10VHv6:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSNYAWN WIRQPPGKGLEWIG
YIYYSGNTNYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAT SYYGNSFIY
 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2
 (SEQ ID NO: 43), CDR3 (SEQ ID NO: 44) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 45), FR2 (SEQ ID
 NO: 46), FR3 (SEQ ID NO: 47), FR4 (SEQ ID NO: 48) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
 AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACT
 ACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA
 GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
 ATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
 GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 187).

Вариабельная область легкой цепи:

18D10VLv1:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
KSSQSLLNSGNQKNYLTWYQKPGQPPKLLIY WASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYC QNAYSFPWT FGQGTKVEIK (SEQ ID
 NO: 49).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 50), CDR2
 (SEQ ID NO: 51), CDR3 (SEQ ID NO: 52) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 53), FR2 (SEQ ID
 NO: 54), FR3 (SEQ ID NO: 55) и FR4 (SEQ ID NO: 56) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCA

GAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG
 ATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCAGC
 GGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
 CCGTGTACTACTGTCAGAACGCCTACAGCTTCCCCTGGACATTCGGCCAGGGCAC
 CAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 188).

18D10VLv2:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLSGNQKNYLA
 WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
QQAYSEFPWT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 57).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 58), CDR2 (SEQ ID NO: 59), CDR3 (SEQ ID NO: 60) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 61), FR2 (SEQ ID NO: 62), FR3 (SEQ ID NO: 63) и FR4 (SEQ ID NO: 64) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCA
 GAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG
 ATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCAGC
 GGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
 CCGTGTACTACTGTCAGCAGGCCTACAGCTTCCCCTGGACATTCGGCCAGGGCAC
 CAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO: 189).

Последовательности предпочтительных гуманизованных антител были следующими:

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNYAWNWIRQPPGKGLEWIGYIY
 YSGNTNYPNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCATSYYGNSFIYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID

NO: 65).

Последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи:

CAGGTTTCAGCTGCAAGAGTCTGGACCTGGCCTGGTCAAGCCTAGCGAGAC
 ACTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCATCAGCAGCAACTACGCCTGG
 AACTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAAGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACT
 ACAGCGGCAACACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCA
 GAGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCCG
 ATACAGCCGTGTACTACTGTGCCACAAGCTACTACGGCAACAGCTTCATCTACTG
 GGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTC
 TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
 GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGC
 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC
 TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC
 CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT
 GGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATC
 TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
 TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA
 AAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC
 GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACC
 AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 ACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 190).

Аминокислотная последовательность легкой цепи:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLL
 IYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSFPWTFGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID

NO: 66).

Последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCA
 GAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG
 ATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCAGC
 GGCTCTGGAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
 CCGTGTACTACTGTCAGAACGCCTACAGCTTCCCCTGGACATTCGGCCAGGGCAC
 CAAGGTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
 TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT
 CAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
 CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
 GGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 191).

18A9:

Вариабельная область тяжелой цепи:

18A9VHv1:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPS GYAFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDTA VYFCAR
RVRGNSFDS WGQGLVTVSS RVRGNSFDS WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 68), CDR2 (SEQ ID NO: 69), CDR3 (SEQ ID NO: 70) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 71), FR2 (SEQ ID NO: 72), FR3 (SEQ ID NO: 73), FR4 (SEQ ID NO: 74) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACGCCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAACCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTA CTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT

GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 192).

18A9VHv2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGYTFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGI
NPGSGDTVYNEKFQGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRVRGNSFDSW
 GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 75).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 76), CDR2 (SEQ ID NO: 77), CDR3 (SEQ ID NO: 78) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 79), FR2 (SEQ ID NO: 80), FR3 (SEQ ID NO: 81) и FR4 (SEQ ID NO: 82) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACGAGTCTACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT
 GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 193).

18A9VHv3:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQGRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVRGNSF
DS WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 83).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 84), CDR2 (SEQ ID NO: 85), CDR3 (SEQ ID NO: 86) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 87), FR2 (SEQ ID NO: 88), FR3 (SEQ ID NO: 89) и FR4 (SEQ ID NO: 90) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAAGTGGAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT

GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 194).

18A9VHv4:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTLTADKSSMTAYMELSSLRSEDNAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 91).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 92), CDR2 (SEQ ID NO: 93), CDR3 (SEQ ID NO: 94) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FFR1 (SEQ ID NO: 95), FR2 (SEQ ID NO: 96), FR3 (SEQ ID NO: 97) и FR4 (SEQ ID NO: 98) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACAAGTCTAGCATGACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT
 GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 195).

18A9VHv5:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPGSGDTVYNEKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 99).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 100), CDR2 (SEQ ID NO: 101), CDR3 (SEQ ID NO: 102) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 103), FR2 (SEQ ID NO: 104), FR3 (SEQ ID NO: 105) и FR4 (SEQ ID NO: 106) слева направо.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCATCACC
 GCCGACGAGTCTACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT

GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 196).

18A9VHv6:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKPSGYAFTNYLIDWVRQAPGQGLEWMGGI
NPGSGDTVYNEKFQGRVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARRVVRGNSFDS
 WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 107).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 108), CDR2 (SEQ ID NO: 109), CDR3 (SEQ ID NO: 110) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 111), FR2 (SEQ ID NO: 112), FR3 (SEQ ID NO: 113) и FR4 (SEQ ID NO: 114) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACGCCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACAAGTCTAGCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT
 GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 197).

18A9VHv7:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKPS GYTFTNYLID WVRQAPGQGLEWMG
GINPSGDTVYNEKFQ GRVTLTADTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYFCAR
RVRGNSFDS WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 115).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 116), CDR2 (SEQ ID NO: 117), CDR3 (SEQ ID NO: 118) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 119), FR2 (SEQ ID NO: 120), FR3 (SEQ ID NO: 121) и FR4 (SEQ ID NO: 122) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCAG
 CGTGAAGGTGTCCTGCAAGCCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACCTGATCGAC
 TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAATGGATGGGCGGCATCAACCCT
 GGCAGCGGCGATACAGTGTACAACGAGAAGTTCAGGGCAGAGTGACCCTGACC
 GCCGACACCTTACCAGCACCGTCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAG
 GATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAAGAGTGCGGGGCAACAGCTTCGATTCTT

GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTTTCTTCT (SEQ ID NO: 198).

Варибельная область легкой цепи:

18A9VLv1:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLSGNQKNYLT
 WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES GVPDRFSGSGSGKDFTLTISSLQAEDVAVYYC
QNNYFYPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 123).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 124), CDR2 (SEQ ID NO: 125), CDR3 (SEQ ID NO: 126) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 127), FR2 (SEQ ID NO: 128), FR3 (SEQ ID NO: 129) и FR4 (SEQ ID NO: 130) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCA
 GAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG
 ATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCAGC
 GGCTCTGGAAAGGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
 CCGTGTACTACTGCCAGAACAATACTTCTACCCTCTGACCTTCGGCGGAGGCAC
 CAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO:199).

18A9VLv2:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNLSGNQKNYLA
 WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
QNNYFYPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 131).

Здесь подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 132), CDR2 (SEQ ID NO: 133), CDR3 (SEQ ID NO: 134) слева направо, соответственно; и

Неподчеркнутые части представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 135), FR2 (SEQ ID NO: 136), FR3 (SEQ ID NO: 137) и FR4 (SEQ ID NO: 138) слева направо, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATCGTGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGGCCGTGTCTCTGGGAGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCGGCAACCA
 GAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTG
 ATCTACTGGGCCAGCACCCAGAGAAAGCGGCGTGCCAGATAGATTCAGCGGCAGC
 GGCTCTGGAAACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
 CCGTGTACTACTGCCAGCAGAACAATACTTCTACCCTCTGACCTTCGGCGGAGGCAC

CAAGGTGGAAATCAAG (SEQ ID NO : 200).

Пример 2. Фармакологическое исследование гуманизированных антител.

1. Определение аффинности (EC_{50}) гуманизированных антител

Собирали клетки в логарифмической фазе роста, блокировали 3% BSA в течение 30 минут и высевали в круглодонный 96-луночный планшет по 5×10^4 клеток/100 мкл. Планшет центрифугировали при 1100 об/мин в течение 3 минут и надосадочную жидкость отбрасывали. Планшет осторожно постукивали для диспергирования клеток и в каждую лунку добавляли по 50 мкл последовательно разведенных антител (8 градиентов с 5-кратным разведением с начальной концентрацией антител 100 нМ) и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. После инкубации в каждую лунку добавляли по 140 мкл 0,5% BSA для 3-кратного промывания и добавляли 30 мкл/лунку вторичного антитела к человеческому IgG, конъюгированного с AF 647/APC и инкубировали при 4°C в течение 40 минут. После инкубации в каждую лунку добавляли по 140 мкл 0,5% BSA для 3-кратного промывания и, наконец, клетки в каждой лунке ресуспендировали в 50 мкл PBS для FACS-анализа на iQue (Intellicyt, USA) (см. Таблицу 2).

Таблица 2. Результаты исследования аффинности гуманизированных антител.

Панель антител (название)	VL	VH	EC_{50} (нМ)
Химера 18D10	18D10 mVL	18D10 mVH	2,068
h 18D10.v11	18D10VLv1	18D10VHv1	1,131
H18D10.v12	18D10VLv1	18D10VHv2	1,678
H18D10.v13	18D10VLv1	18D10VHv3	0,912
H18D10.v14	18D10VLv1	18D10VHv4	1,744
H18D10.v15	18D10VLv1	18D10VHv5	2,687
H18D10.v16	18D10VLv1	18D10VHv6	2,313
H18D10.v21	18D10VLv2	18D10VHv1	1,069
H18D10.v22	18D10VLv2	18D10VHv2	1,897
H18D10.v23	18D10VLv2	18D10VHv3	0,982
H18D10.v24	18D10VLv2	18D10VHv4	1,926
H18D10.v25	18D10VLv2	18D10VHv5	1,265
H18D10.v26	18D10VLv2	18D10VHv6	1,874
Химера18A9	18A9 mVL	18A9 mVH	1,034

H18A9.v11	18A9VLv1	18A9VHv1	0,645
H18A9.v12	18A9VLv1	18A9VHv2	0,913
H18A9.v13	18A9VLv1	18A9VHv3	0,761
H18A9.v14	18A9VLv1	18A9VHv4	0,548
H18A9.v15	18A9VLv1	18A9VHv5	1,407
H18A9.v16	18A9VLv1	18A9VHv6	0,799
H18A9.v17	18A9VLv1	18A9VHv7	1,425
H18A9.v21	18A9VLv2	18A9VHv1	1,027
H18A9.v22	18A9VLv2	18A9VHv2	0,822
H18A9.v23	18A9VLv2	18A9VHv3	1,170
H18A9.v24	18A9VLv2	18A9VHv4	2,065
H18A9.v25	18A9VLv2	18A9VHv5	0,964
H18A9.v26	18A9VLv2	18A9VHv6	1,405
H18A9.v27	18A9VLv2	18A9VHv7	0,646

2. Цитолитическая ADCC активность антитела CM311 в отношении опухолевых клеток

Брали 30 мл крови в 50 мл центрифужную пробирку, добавляли 15 мл 1×PBS, хорошо перемешивали и смесь медленно добавляли в центрифужную пробирку, в которую было добавлено 20 мл Ficoll-Paque Plus, так чтобы кровь распределялась по поверхности Ficoll-Paque Plus. Центрифужную пробирку центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин при 20°C, отбрасывали верхний слой, представляющий собой сыворотку, собирали лейкоцитарный слой (то есть PBMC) и переносили в 50 мл центрифужные пробирки по 10 мл на пробирку. В каждую пробирку добавляли не менее 30 мл 1×PBS и хорошо перемешивали. Пробирку центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 мин при 4°C, надосадочную жидкость отбрасывали и добавляли в пробирку 10 мл 1×PBS для промывания и подсчета клеток.

Клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с FBS (фетальная бычья сыворотка) и культивировали при 37°C при 5% CO₂ в течение 2 часов. Среду центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость отбрасывали и вновь ресуспендировали клетки в среде RPMI 1640 с FBS и инокулировали в круглодонный 96-луночный планшет по 4×10⁵ клеток/луночку, 50 мкл/луночку. Добавляли упомянутые выше химеру 18D10, химеру 18A9, гуманизированные антитела к клаудину 18.2 18D10, 18A9

(то есть CM311, CM311 является общим названием гуманизированных антител 18D10 или 18A9) и разведения контрольного антитела к KLN (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 мкг/мл) по 25 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 30 минут при 37°C, 5% CO₂. Вынимали планшет и добавляли клетки КАТО III по 8×10³ клеток/лунку, 25 мкл/лунку. Инкубировали планшеты при 37°C при 5% CO₂ в течение 3,5 часов, добавляли 2 мкл 10× лизирующего буфера в лунку, содержащую клетки-мишени, для обеспечения максимального высвобождения и продолжали инкубацию при 37°C при 5% CO₂ в течение 30 минут. Вынимали планшет, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут и надосадочную жидкость переносили в черный планшет для ELISA по 50 мкл/лунку. Добавляли по 50 мкл/лунку субстрата для детекции ЛДГ (лактатдегидрогеназа), инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут и добавляли по 25 мкл/лунку останавливающего раствора для остановки реакции. Измеряли OD (оптическую плотность) при помощи считывающего устройства для микропланшетов (Biotek).

Результат рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ цитолиза} = (\text{OD}_{\text{эксперимент}} - \text{OD}_{\text{высвобождение в контроле}}) / (\text{OD}_{\text{максимальное высвобождение}} - \text{OD}_{\text{высвобождение в контроле}}) \times 100\%$$

Как показано на Фиг. 4, гуманизированные антитела к клаудину 18.2, 18D10 и 18A9, обладали выраженной ADCC активностью.

3. Цитолитическая CDC активность антитела CM311 в отношении опухолевых клеток

Клетки КАТО III в логарифмической фазе роста ресуспендировали до 1×10⁷ клеток/мл. Добавляли CFSE (Sigma, 87444-5MG-F) в конечной концентрации 1 мкМ. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут и добавляли 3 объема среды для остановки реакции. Центрифугировали при 1000 об/мин при 4°C в течение 5 минут, отбрасывали надосадочную жидкость, ресуспендировали в среде и высевали клетки в 96-луночный планшет, 1×10⁵ клеток/лунку, 50 мкл/лунку. Добавляли разведенные упомянутые выше химеру 18D10, химеру 18A9, гуманизированные антитела к клаудину 18.2 18D10, 18A9 (CM311) и контрольное антитело к KLN (гемоцианин лимфы улитки) (концентрации в разведениях составляли 30, 10, 3,33, 1,11, 0,37 мкг/мл) по 50 мкл/лунку. Разводили комплемент до 30% средой и добавляли в планшет по 50 мкл/лунку. Инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 2 часов, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут и надосадочную жидкость

отбрасывали. Раствор PI для окрашивания (разведение 1:200) смешивали с латексными частицами, модифицированными сульфатными группами (Invitrogen, S37227), и затем добавляли в 96-луночный планшет по 100 мкл/лунку. Инкубировали на льду в течение 10 минут и затем анализировали клетки при помощи FACS. Как показано на Фиг. 5, гуманизированные антитела к клаудину 18.2, 18D10 и 18A9, обладали выраженными CDC эффектами.

Пример 3. Получение и анализ конъюгатов антитело-лекарственное средство

1. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

У 10 мг антитела CM311 осуществляли замену буфера на восстанавливающий буфер (25 mM борат натрия, pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) всего три раза, используя устройства для ультрафильтрации 15 мл 30 KD; конечный объем составлял приблизительно 1 мл, переносили в новую центрифужную пробирку Eppendorf (взвешенный) и взвешивали); измеряли концентрацию белка и рассчитывали общее количество белка. К антителу добавляли DTT (дителиотреитол) в количестве, в 2,5 раза превышающем молярное количество антитела, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов и непрерывно перемешивали. У смеси осуществляли замену буфера на буфер для связывания (50 mM Tris, pH 7,2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA), всего три раза, используя устройства для ультрафильтрации 15 мл 30 KD. Отбирали раствор, измеряли A280 для определения концентрации белка и взвешивали и рассчитывали общее количество белка. Отбирали 10 мкл образца и измеряли по методу Элмана для определения количества свободных тиоловых групп.

Кроме того, рассчитывали молярную концентрацию свободных тиоловых групп по следующей формуле:

$$C_{\text{тиол}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} (M)$$

b: длина оптического пути кюветы (обычно 1 см).

Рассчитывали молярное количество свободных тиоловых групп по молярной концентрации свободных тиоловых групп и объему общего раствора белка.

К восстановленному антителу добавляли vc-MMAE (то есть MC-vc-PAВ-MMAE)

(растворенный в DMSO) в количестве, в 1,1 раз превышающем молярное количество свободных тиоловых групп, перемешивали при комнатной температуре и проводили реакцию в течение 2 часов, периодически помешивая. К реакционной смеси добавляли N-ацетилцистеин в количестве, в 20 раз превышающем молярное количество *vc*-ММАЕ (то есть МС-*vc*-РАВ-ММАЕ) в реакционном растворе, смешивали и оставляли смесь в покое на 5 минут. У смеси осуществляли замену буфера на маточный раствор для конъюгации (20 мМ гистидин, 3% сахара, 0,03% Tween-80, pH 5,5) всего три раза, используя устройство для ультрафильтрации 15 мл 30 KD. Полученный продукт конъюгации антитела к клаудину 18.2-ADC (термин, используемый для общего обозначения конъюгатов антитело-лекарственное средство, полученных из гуманизированного антитела 18D10 или 18A9) хранили при 4°C.

2. Определение DAR конъюгатов антитело-лекарственное средство

Нагрузку лекарством (отношение лекарственное средство - антитело, DAR) конъюгатов антитело-лекарственное средство определяли посредством хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-HPLC).

Профиль HIC типичного конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH6/VL1-ADC показан на Фиг. 6. Согласно площади пика в профиле, среднее DAR составляло 3,8.

Аналогично, среднее DAR конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH3/VL2-ADC составляло 3,5.

Среднее DAR конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH6/VL2-ADC составляло 3,4.

Среднее DAR конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18A9-VH7/VL2-ADC составляло 3,0.

Следует отметить, что названия указанных выше конъюгатов антитело-лекарственное средство, такие как CM311-18D10-VH6/VL1-ADC, указывают, что антитело, применявшееся в получении конъюгата антитело-лекарственное средство, представляет собой CM311-18D10-VH6/VL1. Кроме того, название антитела CM311-18D10-VH6/VL1 указывает, что антитело, применявшееся в получении вышеупомянутых конъюгатов антитело-лекарственное средство, представляет собой антитело класса антител 18D10 с вариабельной областью тяжелой цепи VH_{v6} и

вариабельной областью легкой цепи VLv1; как следует из Таблицы 2 выше, специфическое антитело, применявшееся в получении вышеупомянутого конъюгата антитело-лекарственное средство, представляет собой h18D10.v16. Названия оставшихся трех конъюгатов антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH3/VL2-ADC, CM311-18D10-VH6/VL2-ADC и CM311-18A9-VH7/VL2-ADC можно понять с учетом указанного выше. В частности, специфическое антитело, применявшееся в получении конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH3/VL2-ADC, представляло собой h18D10.v23 в Таблице 2; специфическое антитело, применявшееся в получении конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH6/VL2-ADC, представляло собой h18D10.v26 в Таблице 2; специфическое антитело, применявшееся в получении конъюгата антитело-лекарственное средство CM311-18A9-VH7/VL2-ADC, представляло собой h18A9.v27 в Таблице 2.

Пример 4. Фармакодинамическое исследование конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro*

После 1-2 пассажей восстановленных клеточных линий вначале переносили надосадочную жидкость в 15 мл центрифужную пробирку, центрифугировали и полученную надосадочную жидкость отбрасывали; промывали культуральный флакон 5 мл PBS и затем снимали клетки 2 мл трипсина-EDTA. Клетки ресуспендировали средой в указанной выше 15 мл центрифужной пробирке и центрифугировали; надосадочную жидкость отбрасывали, клетки вновь ресуспендировали средой и отбирали 0,5 мл и подсчитывали на счетчике клеток. Клетки высаживали в 96-луночные культуральные планшеты (клетки LT-1C8 по 5000 или 10000 клеток/лунку, клетки LT-M11 по 5000 клеток/лунку, и VxPC-3 по 3000 клеток/лунку); через 24 часа культивирования добавляли последовательно разведенные концентрации конъюгатов антитело-лекарственное средство ADC CM311 (конъюгированные с различными моноклональными антителами CM311) и инкубировали в течение 96 часов, затем в каждую лунку добавляли детектирующий реагент ССК-8 или Presto-Blue и использовали считывающее устройство для микропланшетов для измерений и осуществляли аппроксимацию четырехпараметрической моделью.

Реагенты, использованные в экспериментах, и их источники:

Изделия

Конъюгат антитело-лекарственное	Концентрация	Условия хранения
---------------------------------	--------------	------------------

средство (название)		
CM311-18D10-VH3/VL2-ADC	1,0 мг/мл	2-8°C
CM311-18D10-VH6/VL1-ADC	1,2 мг/мл	2-8°C
CM311-18D10-VH6/VL2-ADC	0,9 мг/мл	2-8°C
CM311-18A9-VH7/VL2-ADC	0,7 мг/мл	2-8°C

Клеточные линии

Линия клеток	Тип клеток	Уровень экспрессии клаудина 18.2	Происхождение	Культуральная среда
LT-M11	Стабильная линия клетокКАТО	Высокая экспрессия	KEYMED BIOSCIENCES CO LTD	IMDM + 20% FBS
LT-1C8	Стабильная линия клетокКАТО	Средняя экспрессия	KEYMED BIOSCIENCES CO LTD.	IMDM + 20% FBS

Результаты эксперимента:

Среднее значение IC₅₀ каждого ADC CM311 показано в Таблице 3. На Фиг. 7 представлен репрезентативный график цитолитического эффекта различных ADC CM311 в отношении клеток LT-M11.

Таблица 3: Значения IC₅₀ различных ADC CM311 в отношении клеточных линий, использовавшихся при скрининге

Линия клеток	CM311-18D10-VH3/VL2-ADC среднее значение IC ₅₀ (нг/мл)	CM311-18D10-VH6/VL1-ADC среднее значение IC ₅₀ (нг/мл)	CM311-18D10-VH6/VL2-ADC среднее значение IC ₅₀ (нг/мл)	CM311-18A9-VH7/VL2-ADC среднее значение IC ₅₀ (нг/мл)
LT-1C8	520,5	253,9	615,1	111,1
LT-M11	200,3	113,8	349,6	155,5
	131,5	51,07	146,6	51,22
VxPC-3	5295	4632	4237	4045

Примечание: На Фиг. 7:

Образец 1: CM311-18D10-VH3/VL2-ADC

Образец 2: CM311-18D10-VH6/VL1-ADC

Образец 3: CM311-18D10-VH6/VL2-ADC

Образец 4: CM311-18A9-VH7/VL2-ADC

Как следует из результатов в Таблице 3 и на Фиг. 7, различные ADC CM311 демонстрировали существенную цитолитическую активность в отношении линий клеток с умеренной и высокой экспрессией клаудина 18.2, но отсутствие существенной цитолитической активности в отношении отрицательной по клаудину 18.2 линии клеток VxPC-3.

Пример 5. Фармакодинамическое исследование конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vivo*

Противоопухолевую активность CM311ADC исследовали в двух моделях рака желудка PDX, STO#025 и STO#523. Обе модели рака желудка имеют повышенные уровни мРНК клаудина 18.2.

Процесс создания модели рака желудка у бестимусных мышей с использованием полученных от пациента ксенотрансплантатов (PDX) был следующим: ткань опухоли объемом приблизительно 15-30 мм³ трансплантировали подкожно на спину бестимусным мышам BALB/c. Когда объем опухоли достигал 150-260мм³, мышей случайным образом делили на группы по 5 мышей в каждой группе, чтобы объем опухоли в разных группах был одинаковым, также принимая во внимание массу тела. Всего получали 4 группы, включая группу плацебо, группу, получавшую введение 1 мг/кг CM311-ADC-1, группу, получавшую введение 3 мг/кг CM311-ADC-1, и группу, получавшую введение 3 мг/кг CM311-ADC-2 (не связывающийся контрольный ADC). Среди них, CM311-ADC-1 относится к конъюгату антитело-лекарственное средство CM311-18D10-VH6/VL1-ADC; по сравнению с CM311-ADC-1, антитело CM311-ADC-2 представляет собой изотипический контрольный IgG1 человека, который не связывается с мишенью на поверхности опухолевых клеток.

Анализ данных: в ходе эксперимента объем опухолей измеряли дважды в неделю. Формула для расчёта объема опухоли (TV) представляет собой: $TV = l \times w^2 / 2$, где l и w представляют собой измеренную длину и ширину опухоли, соответственно. По результатам измерения рассчитывали относительный объем опухоли (RTV), $RTV = V_f / V_0$, где V_0 представляет собой объем опухоли, измеренный во время введения группе (то есть День 0), а V_f представляет собой объем опухоли, измеренный в последний день. Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) = (RTV в группе, получавшей введение/RTV в группе, получавшей плацебо) × 100%. Степень ингибирования

опухолевого роста $TGI\% = (\text{средний объем опухоли в группе, получавшей плацебо} - \text{средний объем опухоли в группе, получавшей введение}) / \text{средний объем опухоли в группе, получавшей плацебо} \times 100\%$. Когда $T/C(\%) \leq 40\%$, и $P < 0,05$, считают, что исследуемый ADC обладает существенным ингибирующим влиянием на опухолевый рост.

Результаты эксперимента:

1) Исследование эффективности CM311ADC на модели рака желудка PDX STO#025 с высокой экспрессией мРНК клаудина 18

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 8 и Фиг. 9. После введения CM311-ADC-1 по 1 и 3 мг/кг, относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) на 28 День составляла 29,86% и 0%, соответственно, а степень ингибирования опухолевого роста TGI% составляла 70,13% и 100%, соответственно, с полной регрессией 0/5 и 5/5 опухолей и частичной регрессией 2/5 и 0/5 опухолей, соответственно; T/C (%) в группе CM311-ADC-2 (3 мг/кг) составляла 67,24%, а TGI % составляла 32,76%. Результаты эксперимента показали, что и CM311-ADC-1 (3 мг/кг), и CM311-ADC-1 (1 мг/кг) обладали существенной ингибирующей активностью на опухолевый рост, тогда как CM311-ADC-2 (3 мг/кг) не обладал существенной противоопухолевой активностью. Мыши с опухолями могли переносить CM311-ADC-1 и CM311-ADC-2 очень хорошо.

2) Исследование эффективности CM311ADC на модели рака желудка PDX STO#523 с высокой экспрессией мРНК клаудина 18

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 10 и Фиг. 11. После введения CM311-ADC-1 по 1 и 3 мг/кг относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) на 28 День составляла 35,60% и 6,79%, соответственно, а степень ингибирования опухолевого роста TGI% составляла 64,40% и 93,21%, соответственно; T/C (%) в группе CM311-ADC-2 (3 мг/кг) составляла 114,81%, а TGI % составляла -14,81%. Результаты эксперимента показали, что и CM311-ADC-1 (3 мг/кг), и CM311-ADC-1 (1 мг/кг) обладали существенной ингибирующей активностью на опухолевый рост, тогда как CM311-ADC-2 (3 мг/кг) не обладал существенной противоопухолевой активностью. Мыши с опухолями могли переносить CM311-ADC-1 и CM311-ADC-2 очень хорошо.

Пример 6. Сравнение активности антитела и конъюгатов антитело-лекарственное средство в отношении клеток *in vitro*

Способ исследования

Клетки линии КАТО III высаживали по 5000 клеток/лунку и через 24 часа

добавляли исследуемые образцы. Готовили по 9 разведений всех исследуемых образцов с шагом 2,4 раза, начиная с конечной концентрации 1000 нг/мл, и инкубировали в течение 96 часов, и измеряли интенсивность флуоресценции при помощи считывающего устройства для планшетов после развития окрашивания с использованием PrestoBlue в течение 60 мин.

Исследуемые образцы были следующими:

Образец 1: CM311, в частности, CM311-18D10-VH6/VL1;

Образец 2: Анти-клаудин-18.2-ADC, в частности, CM311-18D10-VH6/VL1-ADC;

Образец 3: Не связывающийся контрольный конъюгат, в частности, IgG-L1D1 (IgG-L1D1 представляет собой ADC, в котором IgG антитело конъюгировано с низкомолекулярным L1D1 (то есть vcMMAE, иначе говоря MC-vc-PAB-MMAE).

Результаты исследования показаны на Фиг. 12 и в Таблице 4. Как свидетельствует Фиг. 12, анти-клаудин-18.2-ADC (например, CM311-18D10-VH6/VL1-ADC) демонстрировал выраженный цитоллиз со значением EC_{50} 16,37 нг/мл; тогда как CM311 (например, CM311-18D10 -VH6/VL1) и IgG-L1D1 не демонстрировали существенного цитолитического эффекта.

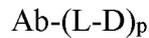
Таблица 4: Сравнительные результаты активности антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство в отношении клеток *in vitro* (результаты аппроксимации 4-параметрической моделью).

Аппроксимация кривой: 4-параметрическая модель
$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

	Параметр	Оценка	Станд.от.	Доверит. интервал
CM311 $R^2 = 0.939$ $EC50 = 1.29e+13$	A	4.087	0.017	[4.046, 4.127]
	B	0.516	0.571	[-0.881, 1.913]
	C	1.29e+13	6.41e+18	[-1.57e+19, 1.57e+19]
	D	-2.42e+4	6.19e+9	[-1.51e+10, 1.51e+10]
Анти-клаудин-18.2-ADC $R^2 = 0.997$ $EC50 = 16.37$	A	4.107	0.017	[4.066, 4.148]
	B	1.437	0.149	[1.073, 1.801]
	C	16.37	1.287	[13.22, 19.52]
	D	3.337	0.015	[3.299, 3.375]
IgG-L1D1 $R^2 = 0.980$ $EC50 = 9.04e+12$	A	4.098	0.013	[4.065, 4.130]
	B	0.555	0.330	[-0.253, 1.362]
	C	9.04e+12	4.62e+18	[-1.13e+19, 1.13e+19]
	D	-7.86e+4	2.23e+10	[-5.45e+10, 5.45e+10]

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, показанную в Формуле I,



Формула I

где:

Ab представляет собой антитело к клаудину 18.2, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, и CDR1 (область, определяющая комплементарность) вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из последовательности SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 68, 76, 84, 92, 100, 108 или 116, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 69, 77, 85, 93, 101, 109 или 117, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 70, 78, 86, 94, 102, 110 или 118, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 50, 58, 124 или 132, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51, 59, 125 или 133, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 52, 60, 126 или 134, или ее мутанта;

D представляет собой цитотоксический агент;

L представляет собой линкер для связывания антитела к клаудину 18.2 с цитотоксическим агентом;

r представляет собой 2,0-8,0.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

CDR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34 или 42, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35 или 43, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36 или 44, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 50 или 58, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой

цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51 или 59, или ее мутанта, и CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 52 или 60 или ее мутанта; или

CDR1 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 68, 76, 84, 92, 100, 108 или 116, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 69, 77, 85, 93, 101, 109 или 117, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 70, 78, 86, 94, 102, 110 или 118, или ее мутанта, CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 124 или 132, или ее мутанта, CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 125 или 133, или ее мутанта, CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 126 или 134, или ее мутанта; или

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,
- (2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,
- (3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,
- (4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,
- (5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,
- (6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,
- (7) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,
- (8) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,
- (9) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,
- (10) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,
- (11) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,
- (12) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,
- (13) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118,

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,
- (2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60,

(3) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,

(4) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134;

предпочтительно, CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4,

(2) SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12,

(3) SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20,

(4) SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

(5) SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,

(6) SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44,

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52,

(2) SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60; или

предпочтительно, CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70,

(2) SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78,

(3) SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86,

(4) SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94,

(5) SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102,

(6) SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110,

(7) SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118,

CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126,

(2) SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

FR1 (каркасный участок) вариабельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 71, 79, 87, 95, 103, 111 или 119, или ее мутанта, FR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 46, 72,

80, 88, 96, 104, 112 или 120, или ее мутанта, FR3 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 73, 81, 89, 97, 105, 113 или 121, или ее мутанта, FR4 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 74, 82, 90, 98, 106, 114 или 122, или ее мутанта, FR1 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53, 61, 127 или 135, или ее мутанта, FR2 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 54, 62, 128 или 136, или ее мутанта, FR3 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 55, 63, 129 или 137 или ее мутант; и FR4 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 56, 64, 130 или 138, или ее мутанта;

предпочтительно, FR1 варибельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37 или 45, или ее мутанта, FR2 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38 или 46, или ее мутанта, FR3 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39 или 47, или ее мутанта, FR4 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из в SEQ ID NO: 8, 16, 24, 32, 40 или 48, или ее мутанта, FR1 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53 или 61, или ее мутанта, FR2 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 54 или 62, или ее мутанта, FR3 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 55 или 63, или ее мутанта, и FR4 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 56 или 64, или ее мутанта; или

предпочтительно, FR1 варибельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 71, 79, 87, 95, 103, 111 или 119, или ее мутанта, FR2 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 72, 80, 88, 96, 104, 112 или 120, или ее мутанта, FR3 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 73, 81, 89, 97, 105, 113 или 121, или ее мутанта, FR4 варибельной области тяжелой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 74, 82, 90, 98, 106, 114 или 122, или ее мутанта, FR1 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 127 или 135, или ее

мутанта, FR2 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 128 или 136, или ее мутанта, FR3 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 129 или 137, или ее мутанта, и FR4 варибельной области легкой цепи содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 130 или 138, или ее мутанта; или

предпочтительно, FR1, FR2, FR3, FR4 варибельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,
- (2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,
- (3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
- (4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
- (5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,
- (6) SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48,
- (7) SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74,
- (8) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,
- (9) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,
- (10) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,
- (11) SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,
- (12) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,
- (13) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122,

FR1, FR2, FR3 и FR4 варибельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,
- (2) SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64,
- (3) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,
- (4) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138;

более предпочтительно, FR1, FR2, FR3 и FR4 варибельной области тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8,
- (2) SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16,
- (3) SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24,
- (4) SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32,
- (5) SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40,

(6) SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48,

FR1, FR2, FR3 и FR4 варибельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56,

(2) SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64; или

более предпочтительно, FR1, FR2, FR3 и FR4 варибельной области тяжелой цепи
антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74,

(2) SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82,

(3) SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90,

(4) SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98,

(5) SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106,

(6) SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114,

(7) SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122,

FR1, FR2, FR3 и FR4 варибельной области легкой цепи антитела к клаудину 18.2
выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

(1) SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130,

(2) SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически
приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

варибельная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из SEQ ID
NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 67, 75, 83, 91, 99, 107 или 115,

варибельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из SEQ ID
NO: 49, 57, 123 или 131;

предпочтительно, варибельная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2
выбрана из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33 или 41,

варибельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из SEQ ID
NO: 49 или 57; или

предпочтительно, варибельная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2
выбрана из SEQ ID NO: 67, 75, 83, 91, 99, 107 или 115;

варибельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из SEQ ID
NO: 123 или 131.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически

приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбраны из следующих комбинаций последовательностей:

- (1) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 57,
- (2) SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 49,
- (3) SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 57,
- (4) SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 131;

предпочтительно, последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 представляют собой SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 49, соответственно.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

константная область тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из константной области человеческого IgG (такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgM, IgA, IgD, IgA или мутанта указанных выше константных областей, предпочтительно, человеческого IgG1;

константная область легкой цепи антитела к клаудину 18.2 выбрана из константной области лямбда человеческого происхождения, константной области каппа или мутанта указанной выше константной области, предпочтительно константной области каппа человеческого происхождения.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где:

аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность SEQ ID NO: 65 или последовательность, имеющую идентичность более 70%, такую как идентичность более 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% с SEQ ID NO: 65;

аминокислотная последовательность легкой цепи антитела к клаудину 18.2 содержит последовательность SEQ ID NO: 66 или последовательность, имеющую идентичность более 70%, такую как идентичность более 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% с SEQ ID NO: 66.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где p представляет собой 2,0-7,0, 2,0-6,0, 2,0-5,0, 2,0-4,0, 3,0-7,0, 3,0-6,0, 3,0-5,0 или 3,0-4,0, предпочтительно p

представляет собой 3,0-4,0, например, р представляет собой 3,0-3,8, предпочтительно 3,0, 3,4, 3,5 или 3,8, более предпочтительно 3,8.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где цитотоксический агент выбран из SN-38, гемцитабина, монометил ауристатина E (ММАЕ), монометил ауристатина F (ММАF), мейтанзиноидов (например, мейтанзина DM1, мейтанзина DM4), калихеамицина, МGBA (например, дуокармицина), доксорубицина, рицина, дифтерийного токсина и других токсинов, I131, интерлейкинов, фактора некроза опухоли, хемокинов и наночастиц;

предпочтительно, цитотоксический агент представляет собой ММАЕ.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где линкер выбран из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропионила (MP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерата (SPP), 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-формила (MCC), N-сукцинимидил(4-иодо-ацетил)аминобензоата (SIAB) и 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-*para*-аминобензилкарбонил (MC-vc-PAB);

предпочтительно, линкер представляет собой 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-*para*-аминобензилкарбонил (MC-vc-PAB).

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли, где

Ab включает:

(а) CDR1, CDR2, CDR3 переменной области тяжелой цепи и CDR1, CDR2, CDR3 переменной области легкой цепи, где последовательность CDR1 переменной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 42, последовательность CDR2 переменной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 43, последовательность CDR3 переменной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 44, последовательность CDR1 переменной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 50, последовательность CDR2 переменной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR3 переменной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 52;

(б) переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где последовательность переменной области тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 41, и последовательность переменной области легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 49;

и/или

(в) тяжелую цепь и легкую цепь, где последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 65, и последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 66;

L представляет собой MC-vc-PAB; и

D представляет собой MMAE.

12. Композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, его фармацевтически приемлемую соль, сольват или сольват указанной соли; возможно, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из химиотерапевтических лекарственных средств, иммунотерапевтических лекарственных средств и иммуносупрессоров, известных в лечении опухолей; или, возможно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

13. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или сольвата указанной соли или композиции по п. 12 в изготовлении лекарственных средств для предупреждения и/или лечения заболевания, связанного с клаудином 18.2;

предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода и рак поджелудочной железы;

более предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

14. Способ предупреждения и/или лечения заболевания, связанного с клаудином 12, включающий введение нуждающемуся субъекту профилактически и/или терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или сольвата указанной соли или композиции по п. 12;

предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода и рак поджелудочной железы;

более предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

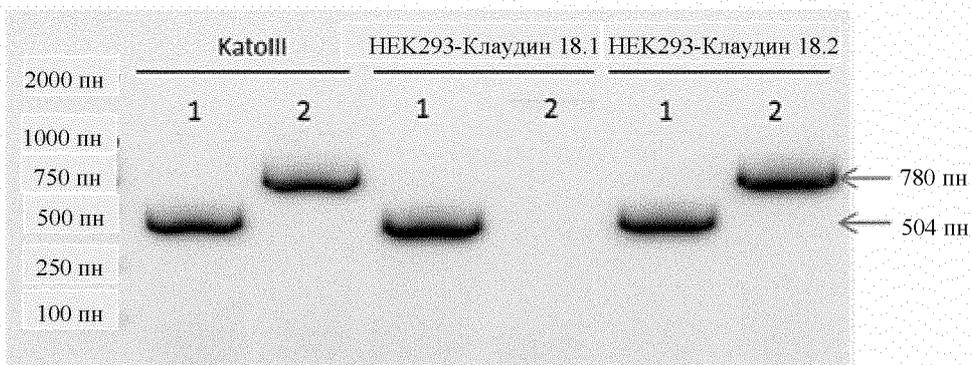
15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват указанной соли или композиция

по п. 12 для применения в предупреждении и/или лечении заболевания, связанного с клаудином 18.2;

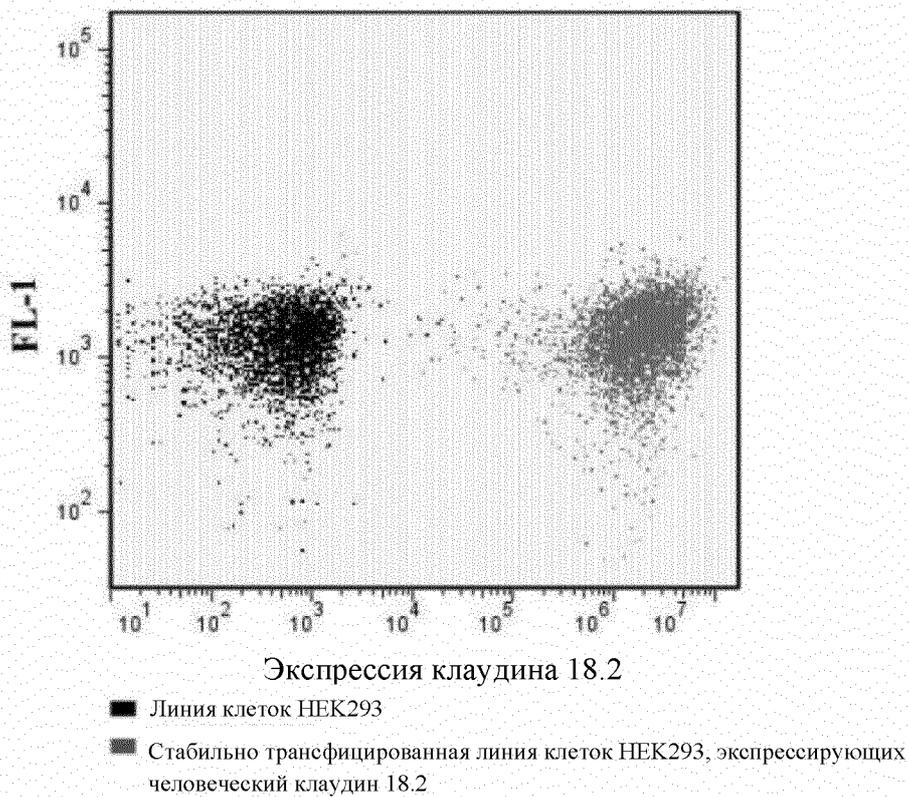
предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка, аденокарциному пищеводно-желудочного перехода и рак поджелудочной железы;

более предпочтительно, заболевание, связанное с клаудином 18.2, представляет собой рак желудка.

1 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

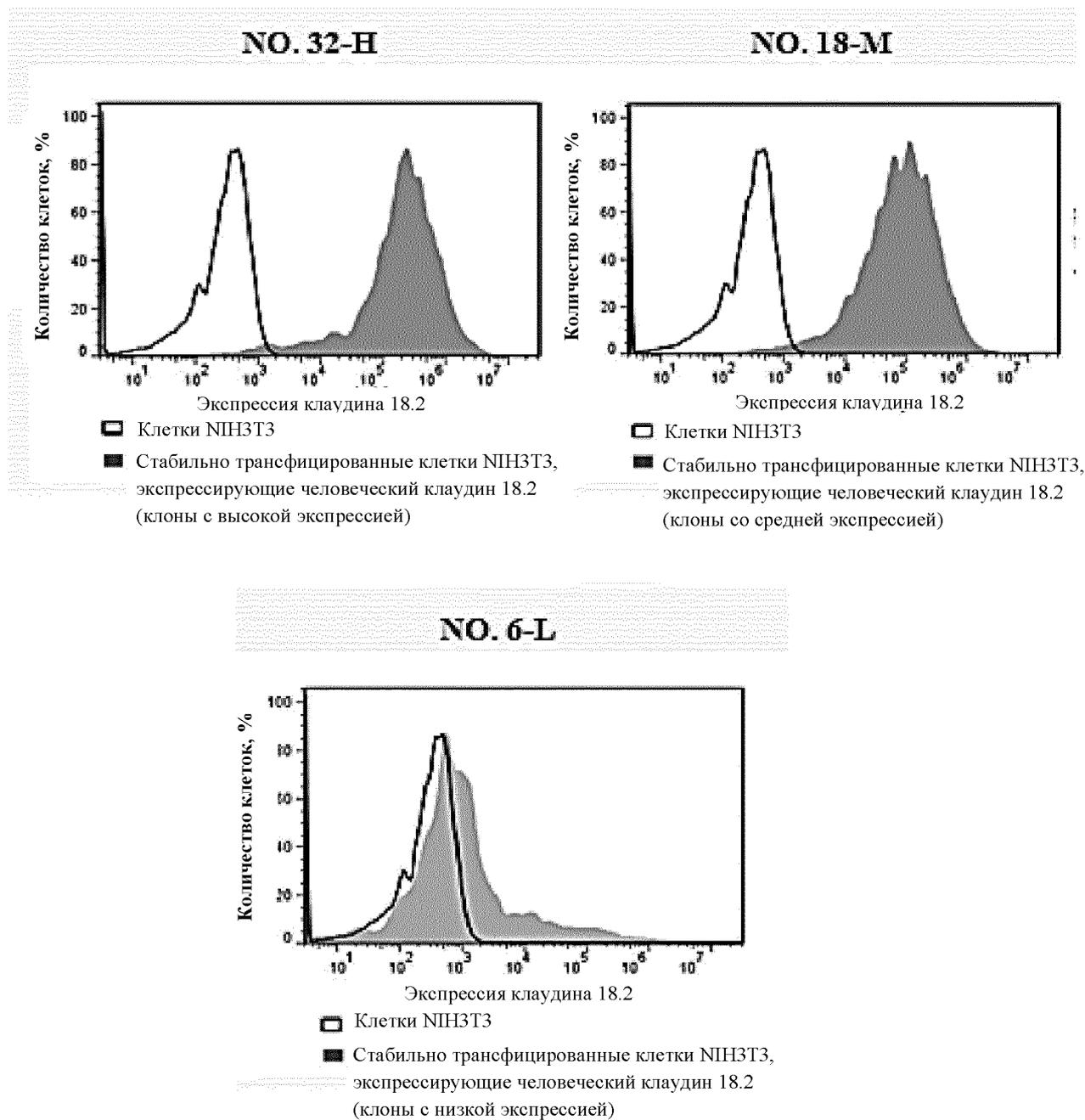


Фиг. 1



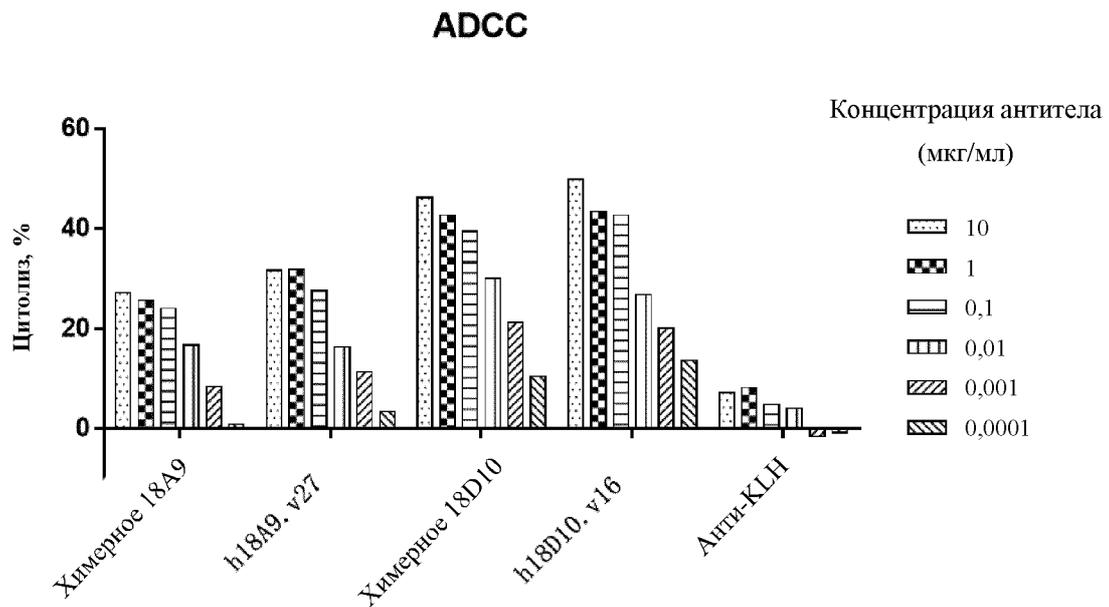
Фиг. 2

2 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

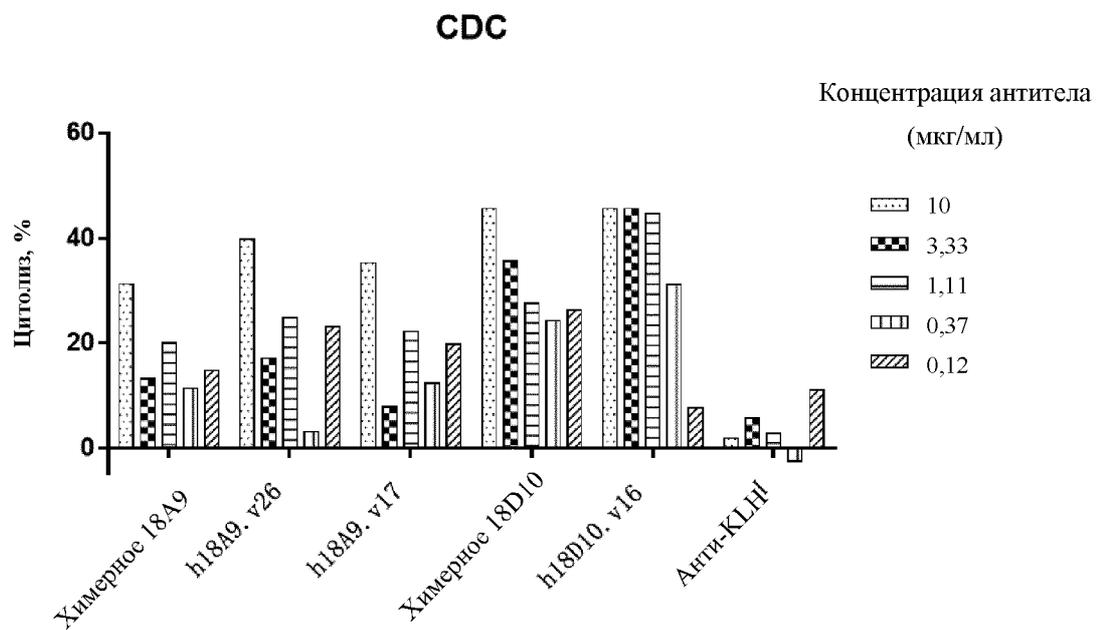


Фиг. 3

3 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

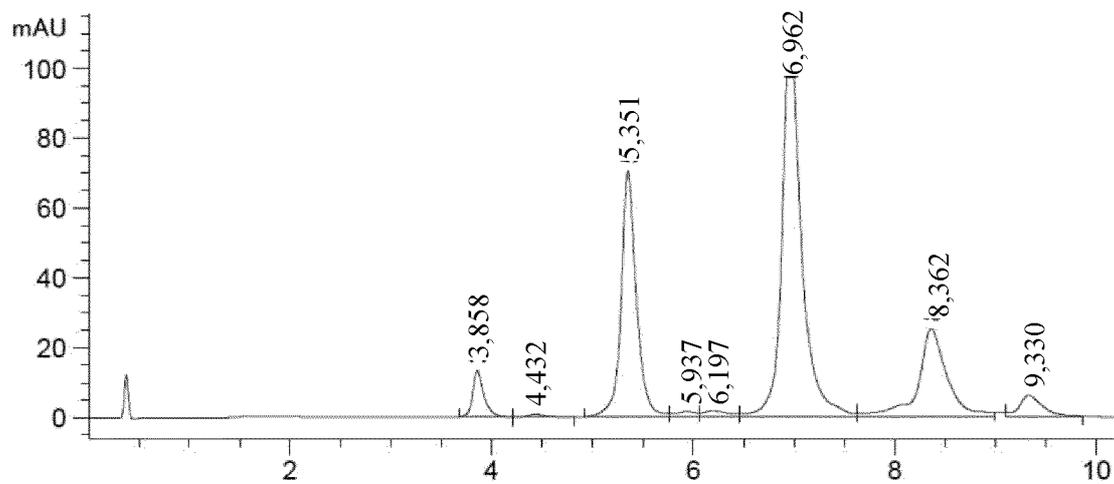


Фиг. 4



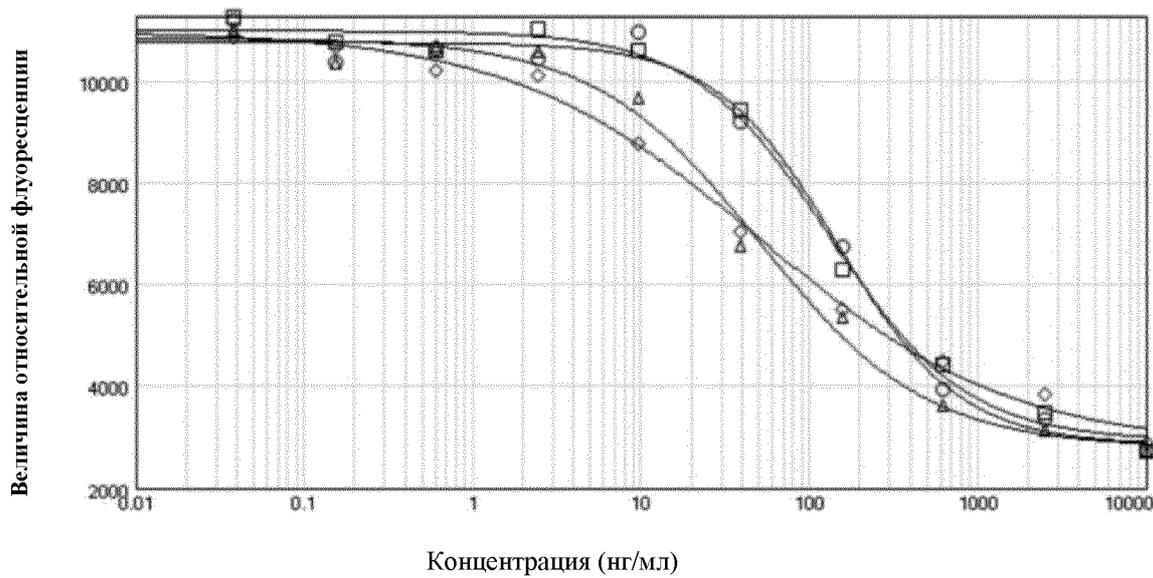
Фиг. 5

4 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ



Фиг. 6

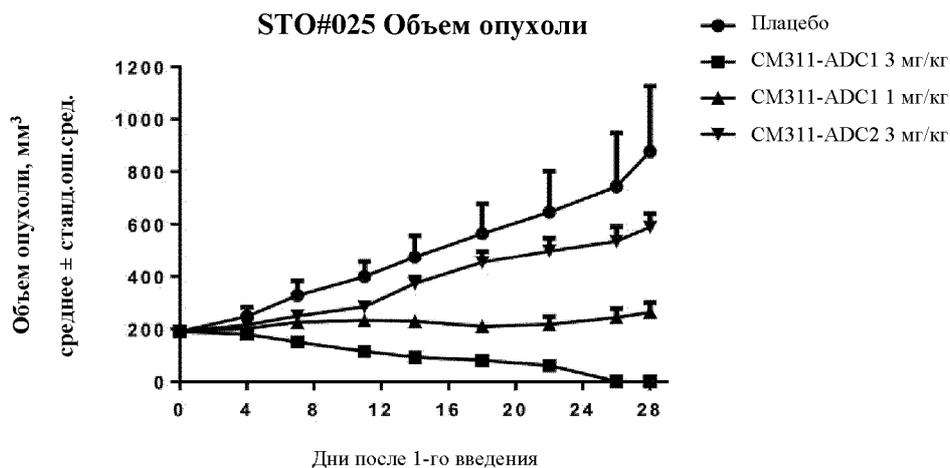
Сравнение



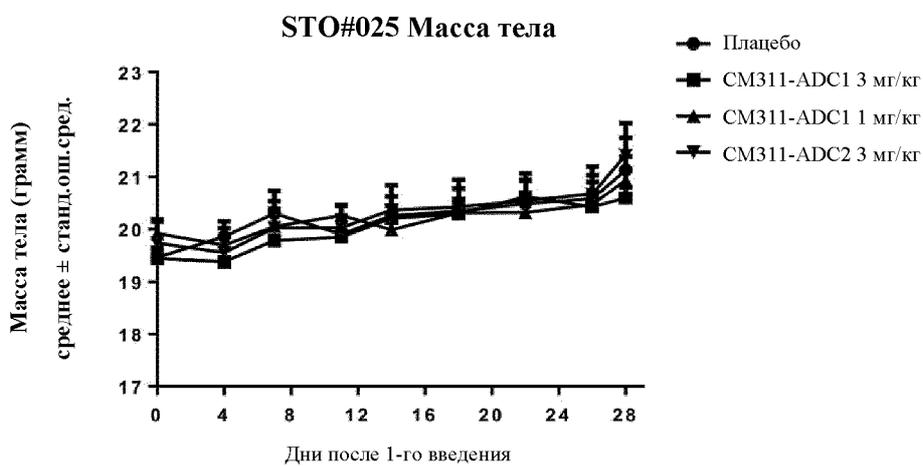
- Образец 1
- △ Образец 2
- Образец 3
- ◇ Образец 4

Фиг. 7

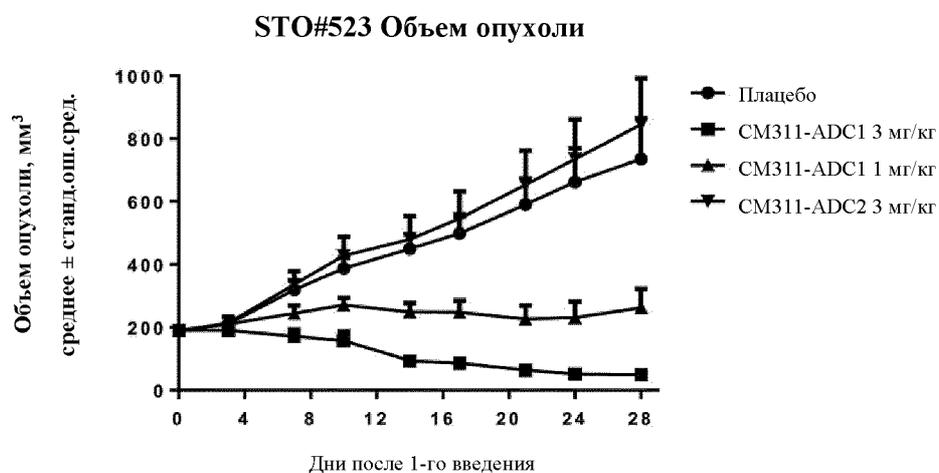
5 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ



Фиг. 8



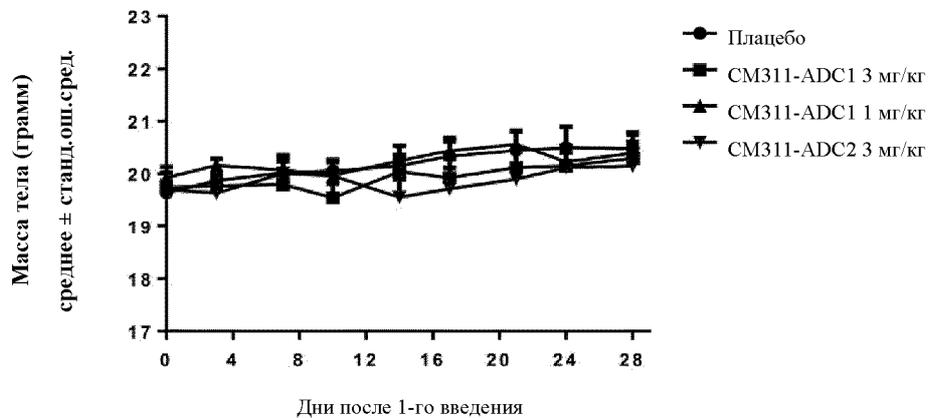
Фиг. 9



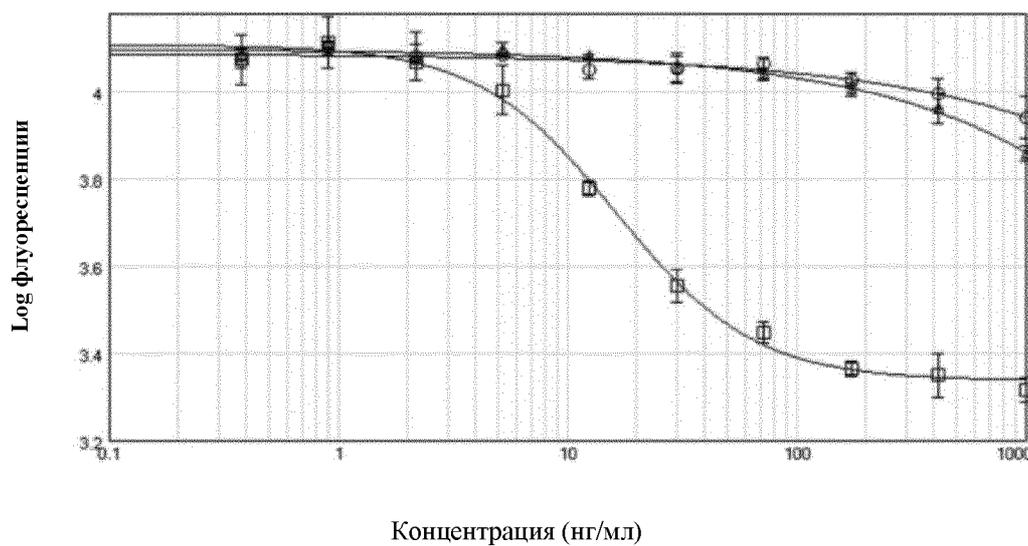
Фиг. 10

6 КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

STO#523 Масса тела



Фиг. 11



Фиг. 12