

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391845** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.24**

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.23**

---

(54) **ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ  
СРЕДСТВО ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2**

---

(31) **20 216 800.1**

(32) **2020.12.23**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/087495**

(87) **WO 2022/136642 2022.06.30**

(71) Заявитель:  
**СОТИО БАЙОТЕК А.С. (CZ)**

(72) Изобретатель:

**Баммерт Лукас (CH), Кырыч  
Садилкова Ленка, Хоскова Симона,  
Валентова Ива (CZ), Вальдмайер  
Лоренц, Берли Роже (CH), Мебиус  
Ульрих (DE)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к ADC на основе антител, связывающихся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2.

**A1**

**202391845**

**202391845**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578248EA/032

### ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Плотные контакты являются мультибелковыми комплексами, соединяющими смежные эпителиальные или эндотелиальные клетки с образованием барьера, предотвращая прохождение молекул между клетками и помогая поддерживать полярность клеток и тканей. Плотные контакты состоят из трех основных групп трансмембранных белков: клаудинов и окклюдина, белков цитоплазматических бляшек и цингулина. Они также содержат цитоскелетные и сигнальные белки, например, актин, миозин II и РКСЗ. Эти белки взаимодействуют, поддерживая структуру плотного контакта (Yu and Turner, 2008).

Клаудины образуют семейство из 23 белков (Hewitt, Agarwal and Morin, 2006). Клаудин 18 является белком человека, кодируемым геном CLDN18 и образующим тяжи плотного контакта в эпителиальных клетках. CLDN18 человека может подвергаться альтернативному сплайсингу с двумя альтернативными первыми экзонами, что приводит к образованию двух изоформ белка, CLDN18.1 (или клаудина 18.1) и CLDN18.2 (или клаудина 18.2). CLDN18.2 впервые описан как белок Zsig28 в WO2000/015659. Две изоформы отличаются 69 N-концевыми аминокислотами, включающими первую внеклеточную петлю. Первый внеклеточный домен пролегает от аминокислоты 28 до аминокислоты 80. В этом тяже есть различия в 8 аминокислот между CLDN18.1 и CLDN18.2. Две разные изоформы экспрессируются в разных тканях, при этом CLDN18.1 преимущественно экспрессируется в ткани легких, в то время как CLDN18.2 демонстрирует специфичность в отношении желудка (Niimi et al., 2001). Экспрессия CLDN18.2 в нормальном желудке ограничена дифференцированными короткоживущими клетками эпителия желудка. Экспрессия CLDN18.2 дополнительно определена в различных опухолевых тканях. Например, обнаружено, что CLDN18.2 экспрессируется в опухолях поджелудочной железы, пищевода, яичника и легких, что коррелирует с разными гистологическими подтипами (Sahin et al., 2008). Аминокислотная последовательность белка CLDN18.2 человека имеет референсную последовательность в NCBI: NP\_001002026.1. Последовательность также можно получать из SEQ ID NO:135.

В свете этого ограниченного профиля экспрессии в нормальных тканях и эктопической экспрессии в злокачественных новообразованиях человека, CLDN18.2 является привлекательной опухолевой мишенью для терапии эпителиальных опухолей антителами. Проведен ряд исследований такой терапии антителами. В WO2004/047863 определены варианты сплайсинга CLDN18 и описан скрининг антител против разных пептидов, полученных из CLDN18.2: пептида DQWSTQDLYN (SEQ ID NO:57), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2, независящего от гликозилирования; пептида NNPVTAVFNYQ (SEQ ID NO:58), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2,

преимущественно негликозилированного; и пептида STQDLYNNPVTAVF (SEQ ID NO:59), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2, негликозилированного. В нем также описаны поликлональные антитела кролика, подвергнутые скринингу с использованием пан-CLDN18 пептида TNFWMSTANMYTG (SEQ ID NO:60) в С-концевом внеклеточном домене, общем для обеих изоформ CLDN18.1 и CLDN18.2. В WO2005/113587 описаны антитела против специфических эпитопов CLDN18.2, определенных пептидными последовательностями: ALMIVGIVLGAIGLLV (SEQ ID NO:61) и RIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVS (SEQ ID NO:62). В WO2007/059997 описаны CLDN18.2-специфические моноклональные антитела, полученные посредством иммунизации пептидом METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQPARRARRTKLGTELGSTPVWWSADGRMDQWS TQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQHSRGR SRRARTKTHLRRGSE (SEQ ID NO:63), включающим первый внеклеточный домен CLDN18.2 с N- и С-концевыми удлиняющими сегментами. Полученные с помощью этой иммунизации антитела опосредуют цитолиз посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Антитело IMAB362, также известное как клаудиксимаб или золбетуксимаб, описано в WO2007/059997 и WO2016/165762. IMAB362 является антителом IgG1, полученным из моноклонального антитела мыши и химеризованным для экспонирования константной области IgG1 человека для клинического использования. В WO2008/145338 также описано связывание антител с перекрывающимися пептидами в первом внеклеточном домене (MDQWSTQDLYNNPVT (SEQ ID NO:64), LYNNPVTAVFNYQGL (SEQ ID NO:65), VFNYQGLWRSCVRES (SEQ ID NO:66), QGLWRSCVRESSGFT (SEQ ID NO:67) и RSCVRESSGFTECRG (SEQ ID NO:68)). В WO2013/167259 описаны антитела, связывающиеся с С-концевыми эпитопами CLDN18.2, для получения антител, нацеленных на С-концевую часть CLDN18.2, для диагностических целей с детекцией экспрессии CLDN18.2 в клетках срезов тканей злокачественных новообразований. Последовательностями двух эпитопов являются TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO:69) и EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO:70). В WO2013/174509 приведены комбинации антител против CLDN18.2 со средствами, стабилизирующими  $\gamma\beta$ -Т-клетки, или средствами, стабилизирующими или повышающими экспрессию CLDN18.2. Антитела можно конъюгировать с терапевтическим веществом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиоактивный изотоп. В WO2014/075788 описан способ лечения злокачественного новообразования с использованием биспецифического антитела, связывающегося с CLDN18.2 и CD3. В WO2014/127906 описаны комбинированные средства, стабилизирующие или повышающие экспрессию CLDN18.2. В WO2016/166122 описаны моноклональные антитела против CLDN18.2, которые могут очень эффективно интернализироваться после связывания с CLDN18.2 и, таким образом, подходят для разработки конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Кроме того, описана конъюгация таких антител с лекарственными средствами

DM4 и MMAE с использованием расщепляемых линкеров SPDB или валина-цитруллина, соответственно. Однако, несмотря на все антитела, описанные в патентных заявках, только химерное IMAB362, описанное в WO2007/059997 и WO2016/165762, в настоящее время тестируют в рамках клинического испытания. В дополнение к этим антителам и ADC, в WO2018/006882 описаны химерные антигенные рецепторы (CAR) на основе моноклональных антител против CLDN18.2. Антитела из WO2018/006882 гуманизировали, и их последовательность описана в разделе "Дополнительные материалы" в Jiang et al., 2018. CAR-T-клетки на основе гуманизованного антитела в настоящее время тестируют в клиническом испытании фазы I (идентификатор на ClinicalTrials.gov: NCT03159819) на пациентах с аденокарциномой желудка на поздней стадии и аденокарциномой поджелудочной железы. В CN109762067 описаны другие моноклональные антитела против CLDN18.2, опосредующие цитотоксичность посредством CDC и ADCC. В WO2019/173420 описаны гуманизированные моноклональные антитела против CLDN18.2 с активностью ADCC. В WO2019/175617 описаны моноклональные антитела против CLDN18.2, связывающиеся с иным эпитопом, чем IMAB362. В WO2019/219089 описаны моноклональные антитела, связывающиеся с мутантом CLDN18.2. Другие антитела, связывающиеся с CLDN18.2, описаны в WO2019/242505, WO2020/038404, WO2020/043044, WO2020/063988, WO2020/082209, WO2020/018852, WO2020/023679, WO2020/135674, WO2020/135201, WO2020/139956, WO2020/025792, WO2020/160560, CN111808194 и WO2020/200196.

Описано, что CLDN18.2 существует в различных конформациях и содержит потенциальный внеклеточный участок N-гликозилирования (см. WO2007/059997, стр 3, первый абзац), что может приводить к теоретически разной топологии/дифференциальному гликозилированию между нормальными и опухолевыми клетками (см. WO2007/059997, стр. 4, второй абзац). Однако ни одно из описанных антител не воздействовало преференциально на CLDN18.2, экспрессирующийся на опухолевых клетках. Т.к. CLDN18.2 экспрессируется не только в опухолях, но также и в здоровой ткани, а именно ткани желудка (Sahin et al., 2008), очевидно, что будет полезно иметь антитела, нацеленные только на CLDN18.2, экспрессирующийся в опухолях, во избежание проблем с безопасностью и побочных эффектов, зачастую ассоциированных с целевым эффектом терапевтических антител в отношении здоровых органов/тканей (Hansel et al., 2010), в частности, как описано для IMAB362 (Sahin et al., 2018; Tureci et al., 2019).

В дополнение к связыванию с мишенями с высокой аффинностью, терапевтические антитела должны сохранять свои желаемые свойства во время разработки, получения, хранения и клинического использования (in vivo). Стабильность антитела может быть подвержена риску при посттрансляционных модификациях (PTM) (Lu et al., 2019; Gervais, 2016). Т.к. неконтролируемые PTM могут приводить к получению антител с эффективностью, активностью, мощностью или стабильностью меньше желаемой, таким образом, очень важно при разработке терапевтических антител конструировать их с



минимальными возможными РТМ. РТМ также могут иметь сильный эффект в отношении нормативно-правового признания, научно-технического обмена или процессов и разработки биосимиляров. Преобладающими модификациями являются окисление, дезамидирование и изомеризация. Кроме того, IMAV362 является химерным антителом, все еще имеющим удлиненную последовательность мыши, что может приводить у некоторых пациентов к образованию антитела против лекарственных средств, которые, например, после повторного использования, могут приводить к снижению эффективности лечения.

Как уже описано выше, IMAV362 также разработан в виде конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (описанного в WO2016/165762), где антитело конъюгировано с лекарственными средствами MMAE или DM4. Лекарственное средство DM4 связывали с IMAV362 через SPBD (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират), реагирующий с аминокетильными и сульфгидрильными группами гетеробифункциональный белковый кросслинкер, который реагирует через N-гидроксисукцинимидный (NHS) сложный эфир с первичными аминами (например, обнаруживаемыми в боковых цепях лизина или на N-конце белков) антитела. Лекарственное средство валин-цитруллин-MMAE связывали с тиолированным IMAV362. В этом случае IMAV362 исходно тиолировали с гетеробифункциональным линкером 2-IT (2-иминотиланом), реагирующим со свободными аминами остатков лизина. Валин-цитруллин является линкером, расщепляемым катепсинами. Все условия, указанные выше в отношении IMAV362, также относятся к ADC на основе того же антитела.

Таким образом, существует потребность в улучшенных антителах и ADC, специфических в отношении CLDN18.2, для использования в лечении пациентов с опухолями.

### **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

"Антитела" или "антитело", также обозначаемые как "иммуноглобулины" (Ig), как правило, содержат четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), и, таким образом, являются мультимерными белками или содержат их эквивалентный Ig-гомолог (например, антитело верблюдовых, содержащее только тяжелую цепь, однодоменные антитела (sdAb) или нанотело, которое можно получать из тяжелой или легкой цепи). Термин "антитела" включает связывающий белок на основе антитела, формат модифицированного антитела, сохраняющий целевую связывающую способность. Термин "антитела" также включает полноразмерные функциональные мутанты, варианты или их производные (включая, в качестве неограничивающих примеров, мышиные, химерные, гуманизированные и полностью человеческих антител), сохраняющие необходимые эпитоп-связывающие признаки молекулы Ig, и включает Ig с двойной специфичностью, биспецифические Ig, мультиспецифические Ig и Ig с двойными переменными доменами. Молекулы Ig могут принадлежать любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) и аллотипу. Молекулы Ig также можно подвергать мутагенезу, например, для

повышения или снижения аффинности к рецепторам Fc $\gamma$  или неонатальному Fc-рецептору (FcRn).

В рамках изобретения термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере одну полипептидную цепь, полученную из антитела, не являющейся полноразмерной и демонстрирующей целевое связывание. Фрагменты антител могут связываться с тем же эпитопом или мишенью, что и соответствующее им полноразмерное антитело. Фрагменты антител включают, в качестве неограничивающих примеров, (i) Fab-фрагмент, являющийся моновалентным фрагментом, состоящим из переменного домена легкой цепи (VL), переменного домена тяжелой цепи (VH), константного домена легкой цепи (CL) и константного домена тяжелой цепи 1 (CH1); (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, являющийся бивалентным фрагментом, содержащим два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области (восстановление F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента приводит к образованию двух Fab'-фрагментов со свободной сульфгидрильной группой); (iii) часть тяжелой цепи Fab (Fa)-фрагмента, состоящая из доменов VH и CH1; (iv) переменный фрагмент (Fv), состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) доменный фрагмент антитела (dAb), содержащий один переменный домен; (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); (vii) одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); (viii) диатело, являющееся бивалентным, биспецифическим антителом, в котором домены VH и VL экспрессируются на единой полипептидной цепи, но с использованием линкера, слишком короткого для спаривания между двумя доменами на одной цепи, таким образом, заставляющего домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и приводящего к образованию двух антигенсвязывающих участков; (ix) линейное антитело, содержащее пару tandemных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей; (x) иммуноглобулин с двойным переменным доменом; (xi) другие неполноразмерные части тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулина или их мутанты, варианты или производные, в отдельности или любой комбинации.

В рамках изобретения "связывающий белок на основе антитела" может представлять собой любой белок, содержащий по меньшей мере один иммуноглобулиновый домен VH, VL или CH, полученный из антитела, в контексте других неиммуноглобулиновых или полученных не из антитела компонентов. Такие белки на основе антитела включают, в качестве неограничивающих примеров, (i) Fc-слитые белки связывающих белков, включая рецепторы или рецепторные компоненты со всеми иммуноглобулиновыми доменами CH или их частями, (ii) связывающие белки, в которых домены VH и/или VL связаны с альтернативными молекулярными каркасами, или (iii) молекулы, в которых иммуноглобулиновые домены VH, и/или VL, и/или CH комбинируют и/или собирают в таком виде, в котором они не встречаются в природных антителах или фрагментах антител.

В рамках изобретения термин "модифицированный формат антитела" включает

конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), полиалкиленоксид-модифицированный scFv, монотела, диатела, антитела верблюдовых, доменные антитела, би- или трицептифические антитела, IgA или две структуры IgG, соединенные J-цепью, и секреторный компонент, антитела акул, каркас обезьян Нового света и не принадлежащие обезьянам Нового Света CDR, антитела IgG4 с удаленной шарнирной областью, IgG с двумя дополнительными участками связывания, сконструированными в доменах CH3, антитела с измененной Fc-областью для повышения или снижения аффинности к рецепторам Fc-гамма, димеризованные конструкции, содержащие CH3, VL и VH, и т.п.

В отношении описанных антител используют схему нумерации Kabat (Martin and Allemn, 2014).

Термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" или "ADC" относится к антителу или фрагменту антитела, с которым связаны токсины (или лекарственные средства). В ADC токсины конъюгированы с антителом или фрагментом антитела с помощью расщепляемых или нерасщепляемых линкеров. Расщепляемый линкер можно конструировать так, чтобы он расщеплялся внеклеточно в опухолевой среде или внутриклеточно в цитозоле. Для расщепляемых линкеров используют дифференциальные условия восстанавливающей способности или ферментативной деградации, которые могут иметь место вне или внутри клетки-мишени. Для нерасщепляемых линкеров необходима интернализация ADC, деградация компонента антитело-линкер под действием лизосомальных протеаз для высвобождения токсинов. Конъюгация линкера с антителом также может варьироваться. Конъюгация может быть основана на наличии остатков лизина и цистеина в полипептидной структуре антитела в качестве точки конъюгации. Реакционноспособные группы на линкере, например, можно конъюгировать с боковой цепью остатков лизина посредством образования амидной или амидиновой связи. Для конъюгации с помощью остатков цистеина необходимо частичное восстановление антитела. Альтернативно, можно использовать сайт-специфическую ферментативную конъюгацию. Для этого необходимы ферменты, реагирующие с антителом, и это может индуцировать сайт-специфические или специфические для аминокислотной последовательности модификации. Пептидные последовательности, распознаваемые этими ферментами, могут потребовать инсерции в генетически сконструированные антитела или фрагменты, чтобы быть конъюгированными. Используемыми для этого ферментами являются сортаза, трансглутаминаза, галактозилтрансфераза, сиалилтрансфераза и тубулин-тирозинлигаза. Обзор конъюгации линкеров для ADC и токсинов можно найти в Ponziani et al, 2020 (Ponziani et al. 2020). Обзор конъюгации токсинов с фрагментами антител можно найти в Aguiar et al, 2018 (Aguiar et al. 2018). Тип линкера и способ конъюгации, используемые для конъюгации токсина с антителом или фрагментом антитела, могут определять соотношение лекарственного средства и антитела (DAR).

Термин "токсин" относится к цитотоксическому и/или цитостатическому средству, которое может быть основано на синтетической, растительной, грибковой или

бактериальной молекуле. Термин "цитотоксический" или "цитостатический" означает, что они ингибируют рост, и/или ингибируют репликацию, и/или уничтожают клетки, в частности, злокачественные клетки, как правило, из-за их повышенного функционального цикла. В предпочтительном варианте осуществления токсин выбран из группы, состоящей из антрациклинов и их производных. Антрациклины являются соединениями-антибиотиками, демонстрирующими цитотоксическую активность, и могут уничтожать клетки с помощью разных механизмов, включая интеркаляцию молекул лекарственного средства в ДНК клетки или расщепляющую ДНК активность, таким образом, ингибируя ДНК-зависимый синтез нуклеиновых кислот, образование свободных радикалов лекарственными средствами, которые реагируют с клеточными макромолекулами, вызывая повреждение клеток, алкилирование ДНК и/или взаимодействия молекул лекарственных средств с клеточной мембраной. Антрациклины включают доксорубин, эпирубин, идарубин, дауномицин, неморубин и его производные. Хорошо известным и предпочтительным производным антрациклина является PNU-159682, сокращенно обозначаемый как PNU, CAS № 202350-68-3. Он является высокоактивным метаболитом неморубина, имеющим превосходную цитотоксичность. Производные антрациклина считают также включающими токсин в результате конъюгации со специфическими лигандами, где, благодаря используемому механизму конъюгации, некоторые атомы исходного токсина могут отсутствовать (Broggini 2008; Quintieri et al. 2005). В некоторых случаях термин "производные антрациклина" можно понимать как результат лизосомальной деградации, где фрагмент линкера может оставаться присоединенным к молекуле антрациклина. В рамках изобретения термин "антрациклины" относится к антрациклинам и производным антрациклина.

В рамках изобретения термин "селективно связывается с CLDN18.2" или "селективное связывание с CLDN18.2" относится к антителу, демонстрирующему связывание с CLDN18.2, но не демонстрирующему (специфическое) связывание с CLDN18.1. Таким образом, антитела, селективно связывающиеся с CLDN18.2, не демонстрируют перекрестную реактивность в отношении CLDN18.1.

Когда в настоящем описании и формуле изобретения используют термин "содержащий", он не означает исключения других элементов. В целях по настоящему изобретению термин "состоящий из" считают предпочтительным вариантом термина "состоящий из". Если далее в настоящем описании группу определяют как содержащую по меньшей мере некоторое количество вариантов осуществления, это также следует понимать как описание группы, предпочтительно состоящей только из этих вариантов осуществления.

Термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если конкретно не указано иное.

Технические термины используют в их общепринятом смысле. Если некоторым терминам передано конкретное значение, определения терминов будет дано далее в контексте, в котором термины используют.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения неожиданно идентифицировали новые конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), включающие антитела против CLDN18.2 и токсин, как представлено в настоящем описании, демонстрирующие повышенное связывание с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, по сравнению со здоровыми клетками желудка, экспрессирующими CLDN18.2, и/или имеющие улучшенную стабильность, и/или являющиеся гуманизированными, при этом сохраняющими свои улучшенные свойства.

Таким образом, настоящее изобретение относится к ADC на основе антитела, связывающегося с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью, экспрессирующей CLDN18.2. В одном из вариантов осуществления здоровые клетки или ткань, используемые для сравнения, являются здоровыми клетками желудка или здоровой тканью желудка.

Повышенное связывание антитела или его фрагмента, представленного в настоящем описании, с опухолевой тканью можно продемонстрировать биоаналитическими способами, такими как проточная цитометрия (FC) или иммуногистохимия (ИHC), как показано в примерах 4 и 5, соответственно. Опухоль, экспрессирующую CLDN18.2, можно получать посредством подкожной инъекции мыши Balb/c CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549. CLDN18.2-экспрессирующие клетки A549 можно получать, как показано в примере 4, и они доступны под регистрационным номером DSM ACC3360 и депонированы на 6 декабря 2019 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig DE. Здоровую ткань (например, здоровую ткань желудка) также можно получать из мыши, несущей опухоль. Таким образом, повышенное связывание с опухолевой тканью относительно здоровой ткани можно продемонстрировать на опухолевой ткани и здоровой ткани, полученных из одного животного.

Повышенное связывание с CLDN18.2, экспрессирующимся в опухолевой ткани, может являться результатом посттрансляционной модификации, такой как дифференциальное гликозилирование CLDN18.2, или неправильного фолдинга CLDN18.2 по сравнению с CLDN18.2, экспрессирующимся в здоровой ткани.

Для тестирования связывания антитела в качестве биоаналитического способа можно использовать проточную цитометрию (FC). Процент CLDN18.2-положительных клеток, например, можно измерять посредством FC с помощью специфического антитела против CLDN18.2. Другим возможным показателем связывания, например, может являться соотношение процентной доли CLDN18.2-положительных клеток в образце опухолевых клеток и процентной доли CLDN18.2-положительных клеток в образце клеток, полученном из здоровой ткани, такой как здоровая ткань желудка. Повышенное связывание антитела с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, полученными из CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549, по сравнению со здоровыми

клетками, такими как здоровые клетки желудка, можно продемонстрировать с помощью соотношения  $>2$ ,  $>5$ ,  $\geq 10$ , предпочтительно -  $\geq 15$ , и более предпочтительно -  $\geq 20$ .

Повышенное связывание антитела с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, полученными из CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549, по сравнению со здоровыми клетками, такими как здоровые клетки желудка, также можно описать, демонстрируя, что антитело связывается с в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, предпочтительно - по меньшей мере 15 раз, предпочтительно - по меньшей мере 20 раз большим количеством опухолевых клеток, чем здоровых клеток, таких как здоровые клетки желудка.

Для тестирования связывания антитела в качестве биоаналитического способа можно использовать иммуногистохимию (ИНС). Образец ткани, используемый для ИНС, предпочтительно, необходимо подвергать быстрой заморозке после резекции, а после размораживания фиксировать в ацетоне, например, как показано в примере 5. Т.к. CLDN18.2 является белком плотного контакта в здоровой ткани, положительное окрашивание на CLDN18.2 должно приводить к визуализации преимущественно мембранного окрашивания области контакта между клетками в здоровой ткани и/или опухолевой ткани. Таким образом, отрицательное окрашивание CLDN18.2 или слабое окрашивание должно приводить к отсутствию мембранного окрашивания.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 со значением полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) выше 0,4 мкг/мл, выше 0,5 мкг/мл, предпочтительно - выше 0,6 мкг/мл, но не выше 1 мкг/мл при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC) на клетках НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки НЕК293Т, гиперэкспрессирующие CLDN18.2, можно получать, как описано в примере 3. Значение  $EC_{50}$  антитела при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC) на клетках НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, может составлять от 0,4 до 1 мкг/мл, от 0,5 до 1 мкг/мл или, предпочтительно, от 0,6 до 1 мкг/мл.

Альтернативно, значение  $EC_{50}$  антитела можно сравнивать со значением  $EC_{50}$  ИМAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, где значение  $EC_{50}$  антитела составляет в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, предпочтительно - по меньшей мере 1,5 раза, более предпочтительно - по меньшей мере 2 раза, даже более предпочтительно - по меньшей мере 2,5 раза выше значения  $EC_{50}$  ИМAB362, но не более, чем в 5 раз выше значения  $EC_{50}$  ИМAB362. Значение  $EC_{50}$  антитела по изобретению может составлять в 1,1-2,5 раз, 1,2-2,5 раз, предпочтительно - 1,5-2,5 раз, или более предпочтительно - 2-2,5 раза выше значения  $EC_{50}$  ИМAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 со значением  $EC_{50}$  выше 0,6 мкг/мл, выше 1 мкг/мл, предпочтительно - выше 1,5 мкг/мл, более предпочтительно - выше 2 мкг/мл, но не выше 3 мкг/мл при измерении с

помощью титрования посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High. Клетки PA-TU-8988S-High можно получать, как описано в примере 2. Значение EC<sub>50</sub> антитела при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High может составлять от 0,6 до 3 мкг/мл, от 1 до 3 мкг/мл, предпочтительно - от 1,5 до 3 мкг/мл, или более предпочтительно - от 2 до 3 мкг/мл.

Альтернативно, значение EC<sub>50</sub> антитела можно сравнивать со значением EC<sub>50</sub> IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High, где значение EC<sub>50</sub> антитела составляет в по меньшей мере 1,5 раз, по меньшей мере 2 раза, предпочтительно - по меньшей мере 3 раза, более предпочтительно - по меньшей мере 4 раза выше, но не более чем 5 раз выше значения EC<sub>50</sub> IMAB362. Значение EC<sub>50</sub> антитела при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High может составлять в 1,5-5 раз, 2-5 раз, 3-5 раз или 4-5 раз выше значения EC<sub>50</sub> IMAB362.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 со значениями maxMFI в пределах  $\pm 40\%$  значения maxMFI IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Антитело или его фрагмент также может связываться с CLDN18.2 со значениями maxMFI в  $\leq 2$  раз выше значения maxMFI IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High.

Антитело или его функциональный фрагмент с повышенным связыванием с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, может обладать терапевтическими преимуществами по сравнению с антителами, неспособными различать здоровую ткань, экспрессирующую CLDN18.2, и опухолевую ткань, экспрессирующую CLDN18.2. Опухолеспецифические антитела могут не приводить к проблемам с безопасностью и побочным эффектам, зачастую ассоциированным с целевым эффектом терапевтических антител в здоровых органах/тканях (Hansel et al., 2010). Такие нежелательные эффекты описаны, например, для IMAB362 (Sahin et al., 2018; Tureci et al., 2019).

Изобретение также относится к ADC, содержащему антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, содержащему последовательности определяющей комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно, и токсин. В одном из вариантов осуществления токсин является антрациклином.

В другом варианте осуществления авторы настоящего изобретения сконструировали новые ADC на основе новых антител против CLDN18.2 из указанных выше, которые неожиданно демонстрируют лучшую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток по сравнению со схожим ADC на основе IMAB362.

ADC по изобретению имеет общую формулу A-(L-T)<sub>n</sub>, где

А является антителом или его фрагментом, связывающимся с CLDN18.2, содержащим последовательности определяющих комплементарность областей (CDR) тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно,

- a. L является линкером, и
- b. T является токсин,
- c. где токсин является антрациклином.

В одном из вариантов осуществления n является целым числом  $\geq 1$  и  $\leq 10$ . Изобретение также относится к фармацевтически приемлемой соли или сложному эфиру ADC.

Изобретение также относится к ADC, содержащему антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, содержащему последовательность HCDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO:23 и последовательность LCDR3 легкой цепи SEQ ID NO:26.

Соответствующие консенсусные последовательности можно найти в таблице 1. Следует понимать, что любой ADC, содержащий антитело или его фрагмент на основе любой комбинации CDR, полученных из консенсусных последовательностей и связывающихся с CLDN18.2, является частью изобретения.

Таблица 1: Консенсусные последовательности CDR выделенного антитела

<b>CDR</b>	<b>Последовательность</b>	<b>SEQ ID</b>
<b>HCDR1</b>	DYAMX X в 5-ом положении является H или Y	SEQ ID NO:21
<b>HCDR2</b>	WINXYTGKPTYXXXFXG X в 4-ом положении является T или A; X в 12-ом положении является A или S; X в 13-ом положении является D или Q; X в 14-ом положении является D или K; X в 16-ом положении является K или Q	SEQ ID NO:22
<b>HCDR3</b>	AVXYGYTMDA X в 3-ем положении является F или Y	SEQ ID NO:23
<b>LCDR1</b>	RXSEDIYSNXA X во 2-ом положении является A или T; X в 10-ом положении является L или F	SEQ ID NO:24
<b>LCDR2</b>	XXXRLQD X в 1-ом положении является S или A; X во 2-ом положении является V или I; X в 3-ем положении является K или N	SEQ ID NO:25

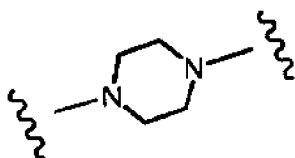


<b>LCDR3</b>	LQGSXFPLT X в 5-ом положении является K или N	SEQ ID NO:26
--------------	--	--------------

В одном из вариантов осуществления линкер L ADC по изобретению содержит по меньшей мере один нерасщепляемый линкерный элемент. Нерасщепляемый линкерный элемент можно определять как линкерный элемент, подвергающийся только лизосомальной деградации, не являющийся субстратом специфических ферментов и являющийся стабильным в плазме и цитозоле.

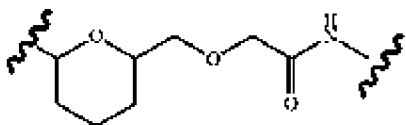
Нерасщепляемый линкерный элемент можно выбирать из группы, состоящей из:

- этилендиамина (EDA),
- N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина,
- диэтиламина (DEA),
- полученного из пиперазина соединения следующей формулы:



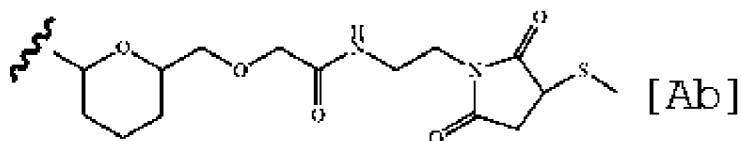
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину и другому линкерному элементу,

- соединения следующей формулы:



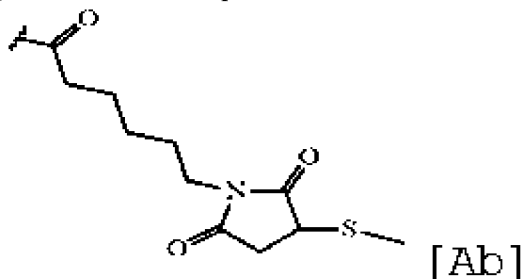
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину и другому линкерному элементу,

- соединения следующей формулы:



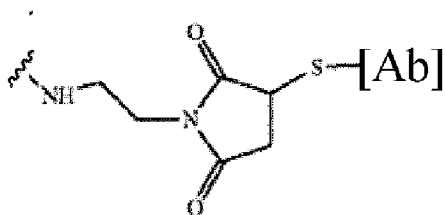
где волнистой линией указан участок присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

- малеимидакапроилового соединения следующей формулы:



где волнистой линией указан участок присоединения к другому линкерному элементу и [Ab] indicates антитело или его фрагмент,

h. соединение следующей формулы:



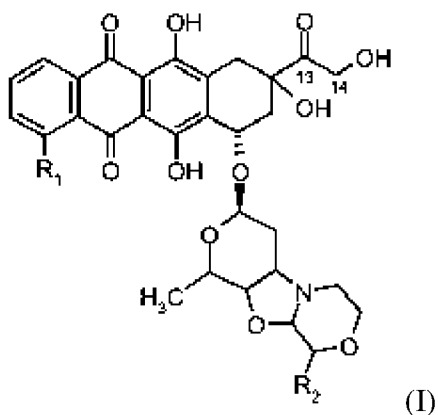
где волнистой линией указан участок присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

и где нерасщепляемый линкерный элемент конъюгирован с токсином посредством амидной связи или эфирной связи.

Нерасщепляемый линкерный элемент можно напрямую ковалентно присоединять к антителу (и, таким образом, получать линкер) или можно присоединять его через другие линкерные элементы, такие как олигопептидные линкерные элементы. Альтернативно или дополнительно, в линкере могут присутствовать расщепляемые линкерные элементы.

Нерасщепляемый линкерный элемент можно связывать с антителом через аминокислоты последовательности антитела, имеющие боковые цепи с доступными нуклеофильными группами, такими как  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> лизина и сульфгидрильной SH-группой цистеина. Малеимидный механизм делает возможной связь с боковой цепью цистеина, в то время как механизм ацилирования, как правило, используют для связывания с боковой цепью лизина. Полную информацию о таких связях можно найти в Jain et al, 2015 (Jain et al. 2015). Связывание нерасщепляемого линкерного элемента с олигопептидным линкерным элементом можно осуществлять с помощью карбодиимидной перекрестной сшивки. Руководство по такому механизму перекрестной сшивки можно найти в Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook (2012) ("Crosslinking Technical Handbook" 2012).

Нерасщепляемый линкерный элемент также можно напрямую присоединять к антрациклину. В одном из вариантов осуществления нерасщепляемый линкерный элемент присоединяют к антрациклину формулы I с помощью амидной связи с C<sub>13</sub> или эфирной связи с C<sub>14</sub>, где R<sub>1</sub> является атомом водорода, гидроксигруппой или метоксигруппой, и R<sub>2</sub> является C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-алкоксигруппой.



Следует понимать, что можно использовать комбинацию одного или более линкерных элементов для образования линкера для связывания антитела с токсином, включая ферментативно расщепляемые линкерные элементы.

В другом элементе линкер дополнительно содержит олигопептидный линкерный элемент, и/или ферментативно расщепляемый линкерный элемент, и/или а спейсерный элемент.

Термин "олигопептидный линкерный элемент" следует понимать как олигопептид, присутствующий в дополнение к пептидной цепи, образующий антитела или их фрагмент. Олигопептидный линкерный элемент можно напрямую присоединять к С-концам тяжелых и/или легких цепей, образующих антитело или их фрагменты. В одном из вариантов осуществления кодирующая последовательность ДНК олигопептидного линкерного элемента может являться частью ДНК, кодирующей соответствующую тяжелую и/или легкую цепь, образующую антитело или его фрагмент.

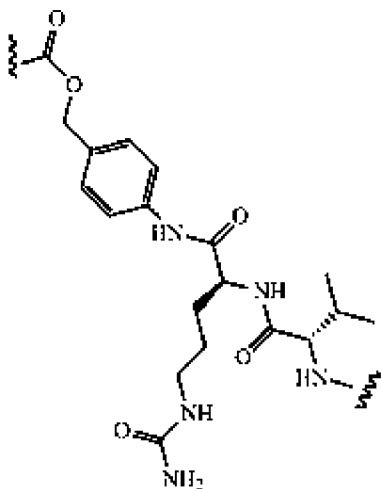
В другом варианте осуществления олигопептидный линкерный элемент может являться результатом лигирования пептидов, используемого для связывания двух или более олигопептидных линкерных элементов. Лигирование можно катализировать пептидными лигазами, такими как сортазы (т.е. сортаза А), аспарагинилэндопротеазы (т.е. бутелаза 1), родственные трипсину ферменты (т.е. трипсилигаза) или полученные из субтилизина варианты (т.е. пептилигаза) (Nuijens et al. 2019). Таким образом, олигопептидные линкерные элементы могут включать мотивы распознавания пептидными лигазами.

В контексте изобретения термин "спейсерный элемент" следует понимать как спейсеры, добавленные в линкер во избежание стерического затруднения и для осуществления правильной конъюгации токсина с антителом или его фрагментом.

В одном из вариантов осуществления олигопептидный линкерный элемент содержит олигопептидный мотив распознавания сортазой, выбранный из: -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXAG<sub>m</sub>-, -LPXSG<sub>m</sub>-, -LAXTG<sub>m</sub>-, -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXTA<sub>m</sub>-, -NPQTG<sub>m</sub>- или -NPQTN<sub>m</sub>-, при этом G<sub>m</sub> является олигоглицином, где m является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ , A<sub>m</sub> является олигоаланином, где m является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ , N<sub>m</sub> является олигоаспарагином, где m является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ , и X является любой возможной аминокислотой. Предпочтительно, m составляет 2 или 3, в частности 2. В предпочтительном варианте осуществления олигопептидным мотивом распознавания сортазой является -LPQTGG- или -LPETGG-. Олигопептидный мотив распознавания сортазой может находиться на С-концах тяжелых и/или легких цепей антитела или его фрагментов, предпочтительно - на С-концах легких цепей.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления олигопептидный линкерный элемент ADC содержит последовательность SEQ ID NO:131. В одном из вариантов осуществления последовательность SEQ ID NO:131 находится на С-конце тяжелой цепи антитела, а в другом предпочтительном варианте осуществления - на С-конце легкой цепи антитела.

В другом варианте осуществления ферментативно расщепляемый линкерный элемент находится в линкере. Ферментативно расщепляемый линкерный элемент может содержать линкер val-cit-PAВ в соответствии с соединением следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к другим линкерным элементам, или антителу, или токсину. Ферментативно расщепляемый линкерный элемент можно присоединять к другому линкерному элементу, или антителу, или токсину с помощью известного механизма перекрестной сшивки, как описано выше для нерасщепляемых линкерных элементов.

В еще одном варианте осуществления линкер дополнительно содержит спейсерный элемент. В одном из вариантов осуществления спейсерный элемент содержит гибкий олигопептид. Гибкие линкерные элементы можно использовать, если связываемым компонентам необходима некоторая степень движения или взаимодействия. Гибкие олигопептиды, как правило, состоят из небольших, неполярных (например, G) или полярных (например, S или T) аминокислот. Небольшой размер этих аминокислот обеспечивает гибкость и делает возможной подвижность соединенных функциональных компонентов. Встраивание S или T может поддерживать стабильность линкера в водных растворах благодаря образованию водородных связей с молекулами воды и, таким образом, уменьшает неблагоприятное взаимодействие между линкером и белковыми соединениями. Дополнительное руководство по гибким олигопептидам можно найти в Chen et al, 2013 (Chen, Zaro and Shen 2013).

Предпочтительно, спейсерный элемент содержит гибкий олигопептид, состоящий из G и S, более предпочтительно - гибкий олигопептид является  $(GGGS)_n$ , где n составляет 1, 2, 3, 4 или 5.

Изобретение также относится к ADC следующих структур:

а. A-([олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

[LPXTGG]-[этилендиамина] и



[LPXTGG]-[ ];

b. A-([олигопептидный линкерный элемент-ферментативно расщепляемый линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub> и предпочтительно, где линкер выбран из:

[LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина], и  
[LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина];

c. A-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

[GGGGS]-[LPXTGG]-[этилендиамина] и



[GGGGS]-[LPXTGG]-[ ]; или

d. A-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-ферментативно расщепляемый линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

[GGGGS]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина], и  
[GGGGS]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина],

где А является антителом или его фрагментом, связывающимся с CLDN18.2, содержащим последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно, и Т является антрациклином.

В одном из вариантов осуществления n является целым числом  $\geq 1$  и  $\leq 10$ . Изобретение также относится к фармацевтически приемлемой соли или сложному эфиру ADC.

Следует понимать, что токсин можно конъюгировать через линкер с С-концами тяжелых и/или легких цепей антитела или с С-концами фрагментов антител.

В предпочтительном варианте осуществления нерасщепляемый линкерный элемент является этилендиамином, и олигопептидный линкерный элемент является LPXTGG, где X является Q или E, предпочтительно, где X является Q.

В одном из вариантов осуществления

- (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями антитела,
- (L-T) ковалентно связан с обеими тяжелыми цепями антитела, или
- (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями и обеими тяжелыми цепями антитела.

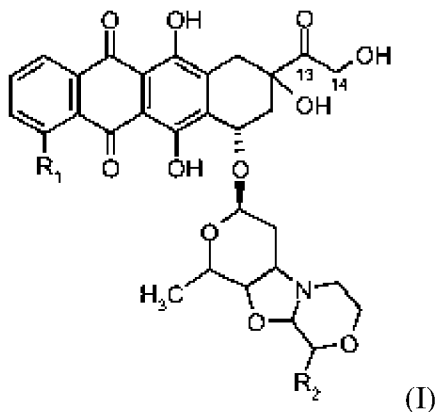
В одном из вариантов осуществления (L-T)

- a. связан с С-концом легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела, или
- b. связан с боковой цепью аминокислоты легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела.

В случае если токсин связан с С-концом легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела, олигопептидный линкерный элемент и необязательный спейсерный элемент могут являться частью аминокислотной последовательности антитела, если антитело рекомбинантно экспрессируют с такой С-концевой меткой. В случае если токсин связан с боковой цепью аминокислоты из аминокислотной последовательности антитела, линкерный элемент можно связывать с помощью малеимидного механизма или механизма ацилирования, в зависимости от выбранной боковой цепи аминокислоты.

Неожиданно, ADC по изобретению с токсином, конъюгированным через олигопептидный линкерный элемент - нерасщепляемый ферментативно линкерный элемент только на HC, через спейсерный элемент - олигопептидный линкерный элемент - нерасщепляемый ферментативно линкерный элемент только на LC, или такими комбинациями линкер-токсин на HC и LC имеют более высокую цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CLDN18.2, чем схожий ADC на основе IMAB362 (см. фигуры 11-19 и пример 8), демонстрируя преимущество недавно идентифицированных антител по сравнению с антителом предшествующего уровня техники также в контексте ADC. ADC по изобретению также имеют более высокую цитотоксическую активность, чем ADC, основанный на IMAB362 и конъюгированный с MMAE через линкер MC-vc-PAB, как описано ранее в WO2016/165762 (см. фигуру 11).

В одном из вариантов осуществления антрациклин имеет следующую формулу (I):



где  $R_1$  является атомом водорода, гидроксигруппой или метоксигруппой, и где  $R_2$  является  $C_1$ - $C_5$ -алкоксигруппой. В одном из вариантов осуществления антрациклин присоединяют к линкеру через  $C_{13}$ , что приводит к утрате  $C_{14}$  и гидроксильной группы, или  $C_{14}$ , что приводит к утрате гидроксильной группы.

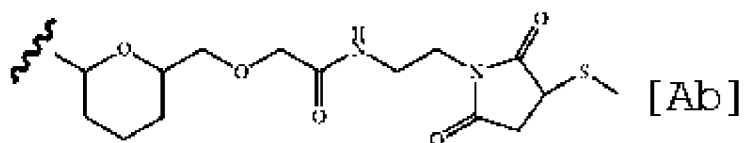
Следует понимать, что связывание токсина (через  $C_{13}$  или  $C_{14}$ ) с антителом не будет влиять на цитотоксическую активность токсина.

Дополнительную информацию о синтезе PNU-159682 и его использовании в качестве токсина в ADC можно найти в Holte D et al 2020 (Holte et al. 2020).

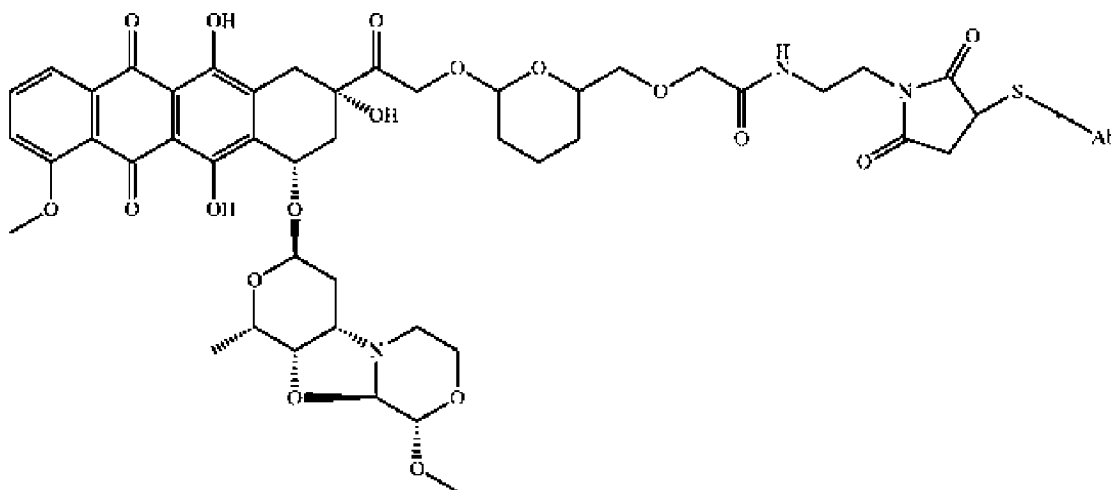
PNU-159682 можно связывать с антителом с помощью нерасщепляемых или

ферментативно расщепляемых линкеров, как показано ниже.

Линкер может являться малеимид-ацетальевым линкером:

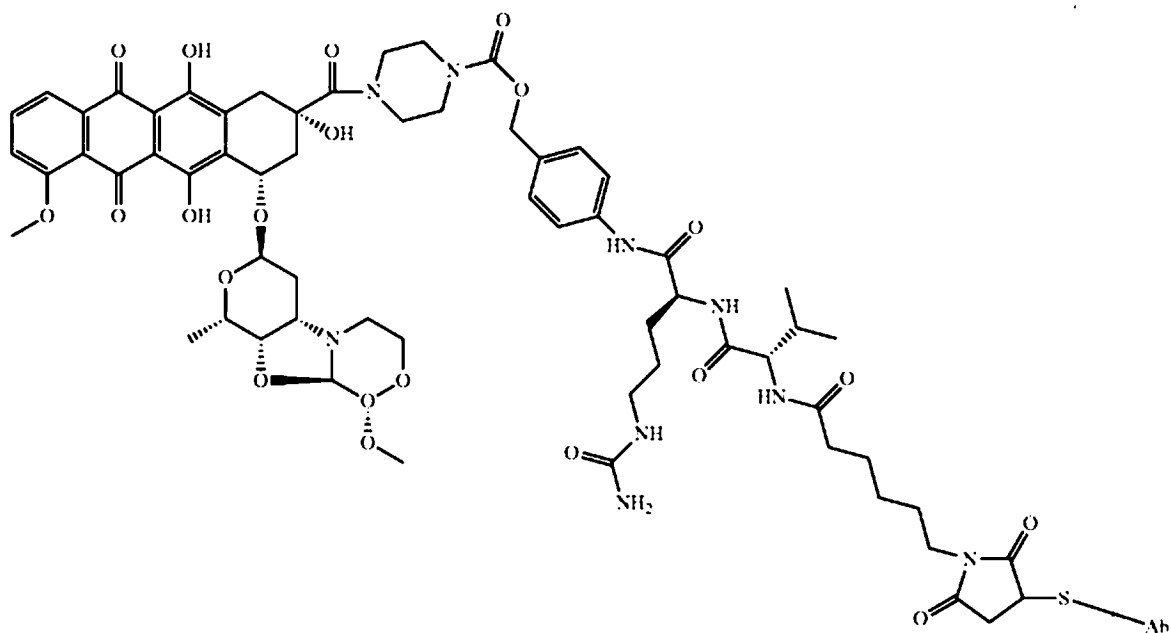


Такой линкер использовали в ADC PNU-159682-малеимид-ацеталь-Ab, показанном ниже:



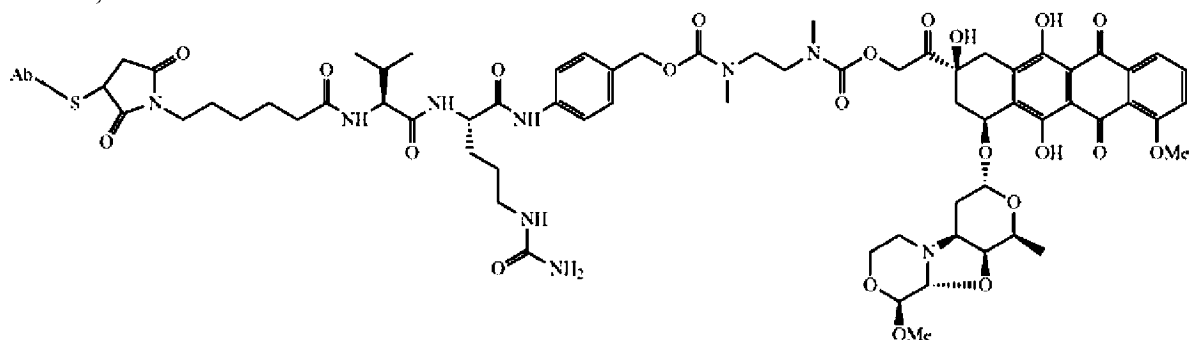
Такой ADC PNU-159682-малеимид-ацеталь-Ab описан в патенте США № 10435471, колонке 90. Соединение PNU-159682-малеимид-ацеталь описано как соединение 51 в WO2010/009124, и его можно получать, как описано в примере 3d (абзацы [0576]-[0578]), на основе соединения, полученного в примере 2 (абзацы [0542]-[0550]) той же заявки.

PNU-159682 также можно связывать с антителом с помощью ферментативно расщепляемых линкеров val-cit-PAВ для получения ADC PNU-159682-val-cit-PAВ-Ab, как показано ниже:



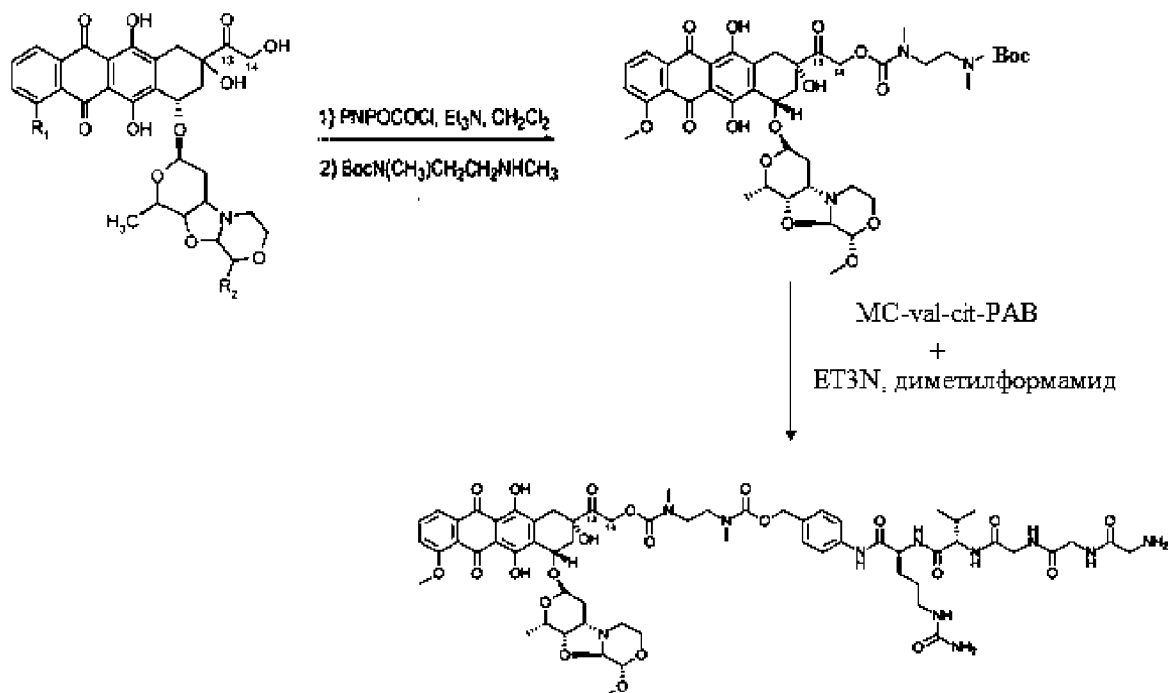
Такой ADC описан в патенте США № 10435471, колонке 91-92. Соединение PNU-159682-val-cit-PAB описано как соединение 55 в WO2010/009124, и его можно получать, как показано в примере 3b (абзацы [0567]-[0573] и фигура 7d) той же заявки.

PNU-159682 также можно связывать с антителом через ферментативно расщепляемый линкер val-cit-PAB и дополнительный нерасщепляемый линкерный элемент, как показано ниже:



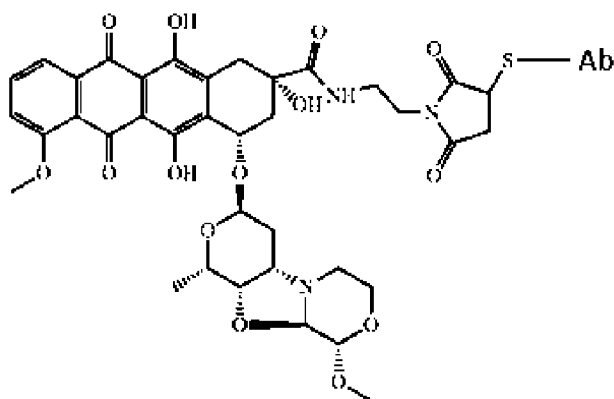
Такой ADC описан в патенте США № 10435471, колонке 91-92, и Yu SF et al., Clin Cancer Research 2015 (Yu et al., 2015). Соединение PNU-159682-val-cit-PAB+нерасщепляемый линкер можно получать следующим образом:





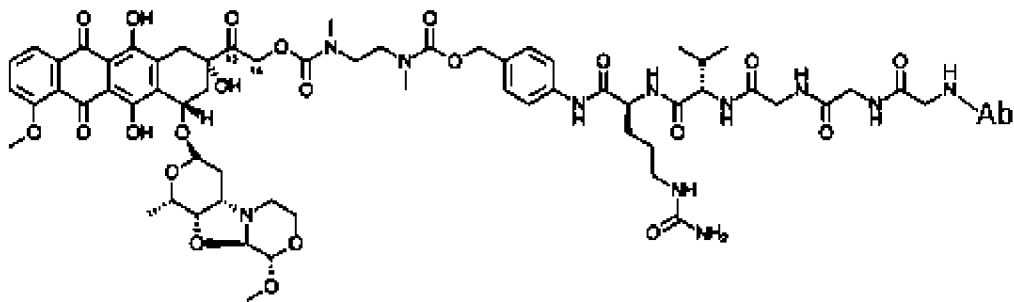
где MC-val-cit-PAB является коммерчески доступным (MedChemExpress, кат. № NY-78738), и Boc является трет-бутилоксикарбонильной защитной группой.

PNU-159682 также можно связывать с антителом через нерасщепляемый малеимидный линкер, как показано ниже:



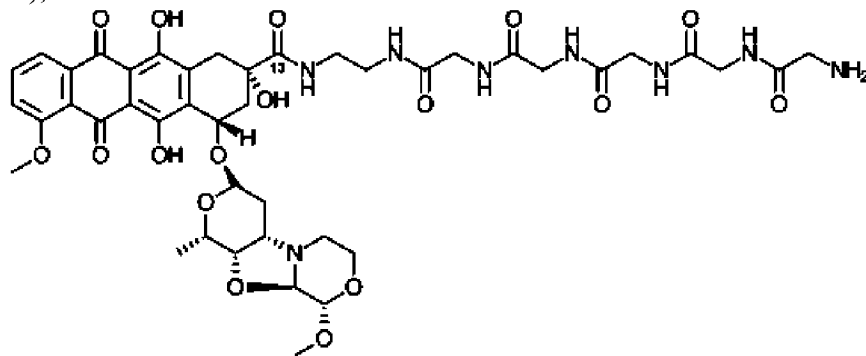
Такой ADC описан в патенте США № 10435471, колонке 93. Соединение PNU-159682-малеимид описано как соединение 55 в WO2010/009124, и его получение описано в примере 3а (абзацы [0564]-[0566] той же заявки).

Для связывания PNU-159682 с антителом также использовали комбинацию нерасщепляемых, ферментативно расщепляемых и олигопептидных линкерных элементов. такой ADC показан ниже:



Такое соединение описано в Stefan et al. (Stefan et al. 2017). Такой ADC можно синтезировать, как описано выше для ADC PNU-159682-val-cit-PAB+нерасщепляемый линкер, заменяя MC-Val-Cit-PAB на Fmoc-Gly3-Val-Cit-PAB (коммерчески доступный в MedChemExpress, кат. № HY-136106), и полученное соединение линкер-токсин можно конъюгировать с антителом, как описано в WO2016/102679, стр. 34, 2-ой абзац.

PNU-159682 также можно связывать с антителом через нерасщепляемый линкерный элемент EDA, комбинируемый с олигопептидным линкерным элементом (-GGGGG-), как показано ниже:



Такое соединение описано в WO2016/102679, фигура 3A. Его можно получать, как показано на схеме фигуры 3B и стр.33, последний абзац, до стр. 34, 1-ый абзац, WO2016/102679 и полученное соединение линкер-токсин можно конъюгировать с антителом, как описано в WO2016/102679, стр. 34, 2-ой абзац. Олигопептидный линкерный элемент, используемый выше, также может представлять собой (-GGG-) или, предпочтительно, (-GG-).

Связывание антитела или аффинность связывания, как правило, выражают в терминах равновесных констант ассоциации или диссоциации ( $K_a$  или  $K_d$ , соответственно), которые, в свою очередь, являются обратными соотношениями констант скорости диссоциации и ассоциации ( $k_{off}$  и  $k_{on}$ , соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут соответствовать разным константам скорости, при условии, что соотношение констант скорости остается одинаковым. Аффинности связывания и/или константы скорости можно определять способами, хорошо известными в этой области или представленными в настоящем описании, такими как ELISA, титрование с помощью проточной цитометрии, изотермическая титрационная калориметрия (ITC), Biacore (SPR), интерферометрия биослоя или флуоресцентная поляризация. В некоторых случаях, из-за природы антигена измерение  $K_a$  или  $K_d$  антител

затруднено. Это особенно актуально для интегральных мембранных белков, таких как клаудины (Hashimoto et al., 2018). В таких случаях интегральный мембранный белок может экспрессироваться в виде протеолипосом или липочастиц. Такие липочастицы можно иммобилизовать на пластике и использовать в анализе ELISA для определения аффинности связывания антител с иммобилизованным антигеном. Таким образом, вместо значений  $K_a$  или  $K_d$  можно вычислять значения полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) для каждого тестируемого антитела или его функционального фрагмента, отражающие его аффинность связывания (или силу связывания) с антигеном. В примере 2 и на фигуре 1 ниже приведены примеры кривых аффинности при анализе ELISA для антител с CDR, содержащимися в консенсусных последовательностях из таблицы 1. Значение  $EC_{50}$  и значение максимального связывания можно использовать для количественного связывания антител с CLDN18.2. Пример 3 ниже относится к вычислению значений  $EC_{50}$  посредством проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих CLDN18.2, для антител с CDR, содержащимися в консенсусных последовательностях из таблицы 1.

Цитотоксическую активность ADC можно охарактеризовывать по значениям  $EC_{50}$ , полученным посредством цитотоксического анализа ADC. Пример 8 и таблица 9 ниже относятся к вычислению значений  $EC_{50}$  ADC по изобретению посредством цитотоксических анализов с использованием клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Хотя значения  $EC_{50}$  связывания антитела (мкг/мл) всех антител hCl, измеренные с помощью линий клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, и линий клеток RA-TU-8988S-High, являются более высокими, чем значение  $EC_{50}$  связывания антитела референсного антитела IMAB362 на тех же линиях клеток (см. таблицу 4 и пример 2), т.е. антитела hCl, представленные в настоящем описании, связываются с CLDN18.2 с меньшей аффинностью по сравнению с IMAB362, авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что значение  $EC_{50}$  цитотоксичности (нг/мл) ADC по изобретению, измеренные на линиях клеток HEK293T и A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, и линиях клеток RA-TU-8988S-High, было ниже значения  $EC_{50}$  цитотоксичности ADC на основе IMAB362 на тех же линиях клеток (см. таблицу 9 и пример 8). Это свидетельствует о том, что ADC по изобретению имеют более высокую цитотоксическую активность, чем ADC на основе IMAB362, несмотря на то, что антитела имеют более низкую аффинность связывания с мишенью, чем IMAB362.

Аналогично, ADC по изобретению демонстрировали более высокую эффективность *in vivo* в моделях полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей, чем ADC на основе IMAB362 (см. пример 9).

В одном из вариантов осуществления изобретение антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит последовательности CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:126 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно.

В одном из вариантов осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

б. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

в. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно;

г. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

д. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

е. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

ж. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

з. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно; или

и. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно.

В другом предпочтительном варианте осуществления ADC на основе антител имеют более высокую цитотоксическую активность в отношении CLDN18.2-экспрессирующих клеток, чем соответствующий ADC на основе IMAB362, например, о чем свидетельствуют значения EC<sub>50</sub> для цитотоксической активности.

В еще одном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

б. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID

NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно; или

с. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно.

В еще одном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:27 и последовательность VL SEQ ID NO:28;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:29 и последовательность VL SEQ ID NO:30;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:31 и последовательность VL SEQ ID NO:32.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:33;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:34;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:35;
- d. последовательность VH SEQ ID NO:36; или
- e. последовательность VH SEQ ID NO:37;

и

- f. последовательность VL SEQ ID NO:38;
- g. последовательность VL SEQ ID NO:39;
- h. последовательность VL SEQ ID NO:40; или
- i. последовательность VL SEQ ID NO:41.

В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:33 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:39;
- d. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- e. последовательность VH SEQ ID NO:35 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- f. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- g. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- h. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- i. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

или

- j. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:39.

В другом варианте осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и содержит:

a. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

b. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

c. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой

цепи SEQ ID NO:52;

d. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;

e. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

f. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54;

g. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;

h. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54;

i. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51; или

j. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и легкая цепь последовательность SEQ ID NO:52.

Константная область легкой цепи CL и константная область тяжелой цепи CH1 и Fc-область описываемых антител могут иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:127 и SEQ ID NO:128, соответственно.

ADC по настоящему изобретению с антрациклин, конъюгированным только с легкой цепью, имеют более высокую цитотоксическую активность в отношении клеток, экспрессирующих CLDN18.2, чем IMAB362 с производным антрациклина, конъюгированным только с легкой цепью (см. фигуры 11-19). ADC по изобретению с антрациклином, конъюгированным с тяжелой и легкой цепью, или только с тяжелой цепью, или только с легкой цепью, также имеют более высокую цитотоксическую активность, чем IMAB362-МС-vc-PAВ-ММАЕ, описанный ранее в WO2016/165762 (см. фигуру 11).

Авторы настоящего изобретения также показали, что ADC по изобретению имеют более высокую цитотоксическую активность *in vivo* в моделях полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей желудка, моделях ксенотрансплантатов опухолей толстого кишечника, моделях ксенотрансплантатов опухолей поджелудочной железы и моделях ксенотрансплантатов опухолей легких, чем идентичный ADC на основе IMAB362 (см. фигуры 21-24, соответственно, и пример 9). В предпочтительном варианте осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и содержит последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и состоит из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO:51.

Антитело может иметь аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении аминокислотной

последовательности антитела по изобретению, демонстрирующего повышенное связывание с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, по сравнению со здоровыми клетками желудка, экспрессирующими CLDN18.2.

В одном из вариантов осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, содержащего:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:27 и последовательность VL SEQ ID NO:28;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:29 и последовательность VL SEQ ID NO:30;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:31 и последовательность VL SEQ ID NO:32.

В дополнительном варианте осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, содержащего:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:33 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:39;
- d. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- e. последовательность VH SEQ ID NO:35 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- f. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- g. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- h. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- i. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

или

- j. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:39.

В дополнительном варианте осуществления антитело связывается с CLDN18.2 и имеет аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, состоящего из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO:51.

В другом варианте осуществления Fc-домен антитела (или фрагмента антитела, при его наличии) может содержать модификации или мутации, такие как модификации или мутации, указанные в таблице 2 ниже. Такую модификацию или мутацию можно встраивать для модуляции эффекторной активности Fc-домена антитела. Модификация антител также может включать пептидные метки, добавленные на C-конец цепи HC и/или LC антитела. Такие метки можно использовать, например, для очистки белка или конъюгации белка.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)<sub>2</sub>, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')<sub>2</sub>, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4,

scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)<sub>2</sub>, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии. В предпочтительном варианте осуществления антитело является антителом типа IgG1. Fc-область иммуноглобулинов взаимодействует со множеством Fcγ-рецепторов (FcγR) и белком комплемента (например, C1q) и опосредует иммунные эффекторные функции, такие как элиминация меченых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Для терапевтических подходов благоприятным может являться повышение или сайленсинг Fc-ассоциированных эффекторных функций. Тип иммуноглобулина (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) можно выбирать по желаемой эффекторной функции антитела, ассоциированной с Fc-доменом. Также можно использовать синтетический иммуноглобулин, такой как иммуноглобулин с аминокислотами 118-260 IgG2 и аминокислотами 261-447 IgG4 или вариант IgG2 с точечными мутациями из IgG4 (например, H268Q/V309L/A30S/P331S). Такие синтетические иммуноглобулины снижают эффекторные функции антитела. Fc-сконструированные иммуноглобулины также можно использовать для модуляции эффекторной функции антитела. В таблице 2 приведен пример такого конструирования Fc. Экспрессия в линиях продуцирующих клеток с измененным фукозилированием также может влиять на связывание FcγR.

Таблица 2: Примеры модификаций для модуляции эффекторной функции антитела. Если не указано иначе, мутации внесены в подкласс IgG1 (Wang, Mathieu and Brezski, 2018).

Конструирование и предполагаемая функция	Мутация	Ссылка
<i>Усиление ADCC</i>		
Повышенное связывание FcγRIIIa	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L S239D/I332E S298A/E333A/K334A в одной тяжелой цепи: L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268 D/D270E/S298A, в противоположной тяжелой цепи: D270E/K326D/A330M/K334E	(Stavenhagen et al., 2007) (Lazar et al., 2006) (Shields et al., 2001) (Mimoto et al., 2013)
Повышенное связывание FcγRIIIa сниженное связывание FcγRIIb	S239D/I332E/A330L	(Lazar et al., 2006)



<i>Усиление ADCP</i>		
Повышенное связывание FcγRIIa, повышенное связывание FcγRIIIa	G236A/S239D/I332E	(Richards et al., 2008)
<i>Усиление CDC</i>		
Повышенное связывание C1q	K326W/E333S S267E/H268F/S324T перекрестный подкласс IgG1/IgG3	(Idusogie et al., 2001) (Moore et al., 2010) (Natsume et al., 2008)
Гексамеризация	E345R/E430G/S440Y	(Diebolder et al., 2014)
<i>Сниженная эффекторная функция</i>		
Агликозилированный	N297A, или N297Q, или N297G	(Bolt et al., 1993; Leabman et al., 2013; Tao and Morrison, 1989; Walker et al., 1989)
Сниженное связывание FcγR и C1q	L235E IgG1: L234A/L235A или L234A/L235A/P329G IgG4: F234A/L235A перекрестный подкласс IgG2/IgG4 IgG2: H268Q/V309L/A330S/P331S IgG2: V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	(Alegre et al., 1992) (Xu et al., 2000; Lo et al., 2017) (Xu et al., 2000) (Rother et al., 2007) (An et al., 2009) (Vafa et al., 2014)
<i>Повышенное время полужизни</i>		
Повышенное связывание FcRn при pH 6,0	M252Y/S254T/T256E M428L/N434S	(Dall'Acqua et al., 2002) (Zalevsky et al., 2010)
<i>Повышение совместного вовлечения</i>		
Повышенное	S267E/L328F	(Chu et al., 2008)

связывание FcγRIIb		
Повышенное связывание FcγRIIa, сниженное связывание FcγRIIIa	N325S/L328F	(Shang et al., 2014)

Время полужизни антител *in vivo* также можно модулировать. Fc-домен играет центральную роль в стабильности антител и времени полужизни в сыворотке. В случае терапевтических подходов, время полужизни антитела можно снижать с использованием фрагмента антитела, в котором Fc-домен отсутствует или усечен, такого как F(ab)<sub>2</sub>, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')<sub>2</sub>, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc или (scFv)<sub>2</sub>. Антитела также могут находиться в форме диател или бивалентных антител. Диатела или бивалентные антитела можно использовать для повышения аффинности к мишени, что делает возможной более низкую дозировку. Функциональные фрагменты, в которых отсутствует Fc-домен или Fc-домены усечены, также можно использовать в разработке других терапевтических подходов, таких как Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки) или привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE). В конструкциях CAR один домен VH и один домен VL, как правило, соединяют коротким пептидным линкером для образования одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), и scFv-фрагмент дополнительно связывают с трансмембранным доменом и внутрицитоплазматическим Т-клеточным иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (например, из CD3ζ) и дополнительными доменами костимуляторных молекул (например, из CD28, 4-1BB (CD127) или OX40) (Chang and Chen, 2017). Домены VH и VL, используемые в scFv-фрагменте, могут являться доменами антител, указанными в таблице 3. BiTE, как правило, состоят из слияния двух scFv двух разных антител. Один scFv-домен может являться доменом из выделенных антител, связывающихся с CLDN18.2, указанным в таблице 3, в то время как другой scFv-домен получают из антитела, связывающегося, например, с CD3, CD16, NKG2D, NKp46, CD2, CD28 или CD25. Подробное руководство по формату антител BiTE и других форматов биспецифических антител, используемых для перенаправления Т-клеток, можно найти в обзоре Diego Ellerman (2019).

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, антитело имеет константную область легкой цепи (CL) SEQ ID NO:127 и, предпочтительно, константную область тяжелой цепи CH1 и Fc-область SEQ ID NO:129 со сниженным связыванием с FcγR и мутации L234A/L235A в константной области тяжелой цепи CH2. Более предпочтительно, антитело с константной областью тяжелой цепи CH1 и Fc-областью SEQ ID NO:130 имеет мутацию L234A/L235A/P329G в константной области тяжелой цепи CH1 и Fc-область с даже более сниженным связыванием с FcγR.

Авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что ADC по настоящему

изобретению на основе антител, имеющих мутации L234A/L235A в CH2 константной области тяжелой цепи, имеют более высокую цитотоксическую активность *in vivo* в моделях полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей, чем идентичный ADC на основе IMA362 (см. фигуру 21С и 23В и пример 9).

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и содержит последовательность VH SEQ ID NO:33, последовательность VL SEQ ID NO:38, константную область легкой цепи (CL) SEQ ID NO:127, константную область тяжелой цепи CH1 и Fc-область SEQ ID NO:129 с L234A/L235A.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2 и состоит из последовательности VH SEQ ID NO:33, последовательности VL SEQ ID NO:38, константной области легкой цепи (CL) SEQ ID NO:127, константной области тяжелой цепи CH1 и Fc-области SEQ ID NO:129 с L234A/L235A.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент является гуманизированным. Гуманизация моноклональных антител хорошо известна. В *The Handbook of Therapeutic Antibodies, Second Edition*, приведена исчерпывающая информация о гуманизации моноклональных антител (Saldanha, 2014), биоинформатических инструментах для анализа таких антител (Martin and Allemn, 2014) и разработке и производстве терапевтических антител (Jacobi et al., 2014).

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент является выделенным антителом или выделенным фрагментом, связывающимся с CLDN18.2.

В дополнительном варианте осуществления антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент не связывается с CLDN18.1. Таким образом, антитело не демонстрирует с перекрестной реактивности или перекрестного связывания с CLDN18.1. Связывание антитела с белком-мишенью можно тестировать посредством проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих белок-мишень. Специфическое связывание тестируемого антитела с его белком-мишенью можно визуализировать на гистограмме. Такой график приводит к пику с высоким сигналом флуоресценции, когда антитело специфически связывается с экспрессируемым белком-мишенью, и к пику с низким сигналом флуоресценции, когда антитело не связывается или лишь очень слабо связывается с экспрессируемым белком-мишенью. Степень связывания также можно выражать на столбиковой диаграмме, на которой показана максимальная средняя интенсивность флуоресценции (maxMFI), измеренная посредством проточной цитометрии, при этом высокая maxMFI отражает сильное связывание, и низкая/отсутствующая maxMFI отражает отсутствие связывания или очень слабое связывание. Сравнение значений maxMFI для разных антител в одних экспериментальных условиях также может свидетельствовать об аффинности антител к мишени, при этом более высокая maxMFI свидетельствует о более низкой скорости обратной реакции и

более высокой аффинности. Примеры таких анализов связывания можно найти в примере 3 и на фигурах 4 и 5.

В другом варианте осуществления ADC связан с другим веществом. Связывание антитела или его фрагмента с другим остатком может являться ковалентным или нековалентным. Вещество может включать радиоактивные изотопы, флуоресцентные метки, гистологические маркеры, цитотоксины или цитокины. Ковалентное связывание остатка с антителом можно облегчать с помощью линкеров, известных в этой области.

В еще одном варианте осуществления специфическое антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, где антитело менее склонно к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAV362. В дополнительном варианте осуществления опухолеспецифическое антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, где антитело не подвергается посттрансляционному дезамидированию. Посттрансляционные модификации (PTM) являются важной проблемой при разработке, получении и хранении антител. Неконтролируемые PTM могут приводить к получению антител с меньшей эффективностью, активностью, мощностью или стабильностью. PTM могут представлять собой N-гликозилирование, гликирование лизина, цистеины, кэпированные другими цистеинами, глутатион или другие сульфгидрил-содержащие соединения из сред для культивирования клеток во время биотехнологической обработки или образование димеров и олигомеров более высокого порядка из-за цистеинов, связанных ковалентными дисульфидными мостиками. Среди PTM, дезамидирование остатков аспарагина (Asn, N), изомеризация остатков аспартата (аспарагиновой кислоты, Asp, D) и образование промежуточных сукцинимидных соединений являются самыми частыми реакциями модификации в случае терапевтических антител во время получения, хранения или после введения *in vivo*. Дезамидирование Asn и изомеризация Asp зависят от предрасположенности последовательности, структурного окружения и условий хранения, в частности, pH раствора и температуры хранения. Эти модификации могут приводить к снижению или даже потере функции или биологической активности, особенно если затронутые остатки участвуют в связывании мишени. Остатки Asn и Asp имеют риск модификаций, особенно когда они находятся в структурно гибких областях, таких как петли CDR, и когда соблюдены некоторые другие структурные условия, в то время как показано, что каркасные области являются сравнительно устойчивыми к модификациям. В дополнение к структурной локализации остатков Asn и Asp, также идентифицированы канонические мотивы дезамидирования Asn и изомеризации Asp. Этими каноническими мотивами являются NG, NS, NN, NT, NH и DG, DS, DD, DT и DH, соответственно (Lu et al., 2019). После анализа *in silico* описанные антитела демонстрируют мотив Asp-изомеризации DG в последней аминокислоте CDR2 домена VL и в областях CH2 и CH3 HC (VL-CDR2 (в положении 62), CH2 (в положении 282), CH3 (в положении 403)).

Изомеризацию Asp можно тестировать, подвергая антитела воздействию низкого pH (т.е. pH 5,5) и нагревания (т.е. 40°C) в течение двух недель, в то время как дезамидирование Asn антител можно тестировать, подвергая антитела воздействию

высокого pH (т.е. pH 8,0) и нагревания (т.е. 40°C) в течение одной недели, имитируя условия производства и хранения.

Авторы настоящего изобретения показали, что описанные антитела в этих жестких условиях хоть и содержат Asn и Asp в своих CDR и несут мотив Asp-изомеризации Asp-Gly (DG), неожиданно не имели дезамидирования Asn (см. таблицу 6) и изомеризации Asp (см. таблицу 7), и что их аффинность связывания с CLDN18.2 не была затронута. С другой стороны, IMAV362 демонстрировало дезамидирование Asn в таких условиях, вызывающее потерю аффинности связывания (как видно в таблице 6 и на фигуре 10). Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их фрагментам, связывающимся с CLDN18.2 и менее восприимчивым, чем IMAV362, к РТМ во время получения, хранения и клинического использования (*in vivo*), что гарантирует сохранение аффинности связывания с CLDN18.2 во время получения, хранения и клинического использования (*in vivo*).

В одном из вариантов осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51.

Изобретение дополнительно относится к антителу, конкурирующему за связывание с антителом, представленным в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание с антителом, содержащим последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51.

Изобретение дополнительно относится к антителу, конкурентно ингибирующему связывание антитела, представленного в настоящем описании, с клаудином 18.2. В одном из вариантов осуществления антитело конкурентно ингибирует связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51, с клаудином 18.2.

Подходящие способы детекции связывания антител с одним и тем же антигеном включают подходы для картирования взаимодействий антиген-антитело. Такие подходы описаны в Abbott, 2014 (Abbott, Damschroder and Lowe, 2014). Подходящие способы детекции конкуренции включают конкурентные анализы посредством биннинг эпитопов, как описано в Abdiche, 2009 (Abdiche et al., 2009). Подходящий способ детекции конкурентного ингибирования включает анализы ELISA.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения ADC по изобретению.

В одном из вариантов осуществления способ включает следующие стадии:

- a. получение А, антитела или его фрагмента с одним или более линкерными элементами,
- b. получение одного или более токсинов Т с одним или более линкерными элементами, и
- c. конъюгация антитела и токсина, приводящая к получению конъюгата антитело-

лекарственное средство.

В одном из вариантов осуществления способ включает следующие стадии:

d. получение А, антитела или его фрагмента с олигопептидным линкерным элементом, предпочтительно, на С-конце, необязательно, с предшествующим спейсерным элементом на легких и/или тяжелых цепях антитела,

e. получение одного или более токсинов Т с нерасщепляемым линкерным элементом, необязательно, с последующим олигопептидным линкерным элементом, и

f. конъюгация антитела и токсина, приводящая к получению конъюгата антитело-лекарственное средство.

Следует понимать, что любое антитело А, представленное в настоящем описании, можно получать с использованием любого олигопептидного линкерного элемента и необязательного спейсерного элемента, представленного в настоящем описании. Аналогично, любой антрациклиновый токсин Т можно связывать с любым нерасщепляемым линкерным элементом, представленным в настоящем описании. Тип конъюгации может зависеть от линкерного элемента и/или способа получения ADC. Представление ADC, получаемого этим способом, можно найти на фигуре 25.

В предпочтительном варианте осуществления ADC по изобретению состоит из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:46 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

В другом предпочтительном варианте осуществления ADC по изобретению состоит из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:133 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

В другом предпочтительном варианте осуществления ADC по изобретению состоит из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:134 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3",4'-ангидро-[2"(S)-метокси-3"(R)-окси-4"-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей описанные ADC и эксципиент.

Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим выделенные опухолеспецифические антитела или их функциональные фрагменты, связывающиеся с CLDN18.2. Последовательности нуклеиновой кислоты могут кодировать CDR в отдельности, области VH и VL или целые тяжелые и легкие цепи антител. Эти последовательности нуклеиновой кислоты можно найти в таблице 3. Последовательность нуклеиновой кислоты также может кодировать F(ab)<sub>2</sub>, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')<sub>2</sub>, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)<sub>2</sub>, неистошающий IgG, диатело, бивалентный антитело или их Fc-сконструированные версии. Кодированный иммуноглобулин может являться IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетическим IgG, IgM или их мутантными и Fc-сконструированными версиями. Нуклеиновые кислоты могут дополнительно содержать кодирующие последовательности олигопептидных линкерных элементов, напрямую слитых с С-концами тяжелых цепей антитела и/или легких цепей антитела.

Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению или вырожденную нуклеиновую кислоту в результате вырожденности кодонов. Экспрессирующий вектор может являться экспрессирующим вектором для экспрессии белков в клетках млекопитающих, бактерий, грибов или насекомых, и выбран по типу клетки-хозяина, несущей экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или их функциональные фрагменты. Всестороннее руководство по конструированию таких векторов можно найти в Green and Sambrook (Green and Sambrook, 2012). Предпочтительными являются экспрессирующие векторы для клеток млекопитающих, особенно клеток CHO.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащей нуклеиновую кислоту или экспрессирующий вектор по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может являться клеткой млекопитающего или линией клеток, бактериальной клеткой, клеткой гриба или клеткой насекомого. Предпочтительными являются клетки млекопитающих, особенно клетки CHO.

В другом варианте осуществления изобретение относится к ADC по изобретению, связывающемуся с CLDN18.2, для применения в лечении.

В другом варианте осуществления изобретение относится к ADC для применения в лечении индивидуума, страдающего неопластическим заболеванием.

В другом варианте осуществления изобретение относится к ADC для применения в

лечении индивидуума, имеющего риск развития неопластического заболевания, и/или индивидуума, у которого диагностировано неопластическое заболевание.

Описанные ADC можно использовать в качестве монотерапии. В предпочтительном варианте осуществления описанные антитела или их фрагменты используют в комбинации с установленным стандартом лечения неопластического заболевания.

Неопластическое заболевание может являться по меньшей мере одним заболеванием, выбранным из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких. Следует понимать, что неопластическое заболевание, подлежащее лечению, экспрессирует CLDN18.2.

В одном из вариантов осуществления индивидуум представляет собой млекопитающего. В предпочтительном варианте осуществления индивидуум является человеком.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу лечения неопластического заболевания, включая рак поджелудочной железы, рак желудка, рак пищевода, рак яичника и рак легких, с использованием ADC, представленного в настоящем описании, где способ включает введение фармацевтически эффективного количества ADC нуждающемуся в этом индивидууму. Способ лечения может представлять собой монотерапию или, предпочтительно, комбинированное лечение с использованием установленного стандарта лечения неопластического заболевания.

Аминокислотная последовательность белка CLDN18.2 человека имеет референсную последовательность NCBI: NP\_001002026.1. Последовательность также можно получать из SEQ ID NO:135.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фигура 1:** Оценка связывания с липочастицами, содержащими CLDN18.2, или нуль-липочастицами выбранных химерных и гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством ELISA, как указано. А. Химерные антитела сC11-1, сC11-2, сC11-3, IMAB362 и только вторичное антитело; В. гуманизированные антитела hC11a-hC11j, химерное сC11-1, IMAB362 и только вторичное антитело. Все недавно полученные антитела связываются с липосомальным CLDN18.2.

**Фигура 2:** Сортировка клеток PA-TU-8988S по уровням экспрессии CLDN18.2. А. Профиль FC PA-TU-8988S, окрашенных с помощью IMAB362. В. Профиль FC клеток PA-TU-8988S, сортированных посредством FACS по высокой экспрессии CLDN18.2.

**Фигура 3:** Получение клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих huCLDN18.2. Клетки HEK293T, неэкспрессирующие CLDN18.2 эндогенно, трансфицировали с помощью плазмиды, кодирующей huCLDN18.2 для стабильной экспрессии CLDN18.2 или кодирующей huCLDN18.1 для стабильной экспрессии CLDN18.1. Экспрессию анализировали посредством FC после окрашивания с помощью IMAB362 и антитела против пан-CLDN18.1 или только вторичного антитела против IgG человека. А. Профиль FC нетрансфицированных клеток HEK293T. В. Профиль FC трансфицированных клеток



НЕК293Т, стабильно экспрессирующих CLDN18.1. С. Профиль FC трансфицированных клеток НЕК293Т, стабильно экспрессирующих CLDN18.2.

Фигура 4: Анализ связывания посредством проточной цитометрии химерных антител сC11-1, сC11-2 и сC11-3 с пре-B-клетками L11, гиперэкспрессирующими CLDN18.1 или CLDN18.2. Химерные антитела связываются с CLDN18.2, но не с CLDN18.1. IMAB362 использовали в качестве положительного контроль связывания.

Фигура 5: Анализ связывания посредством проточной цитометрии гуманизированных антител hC11a-hC11j с клетками НЕК293Т, гиперэкспрессирующими CLDN18.1 или CLDN18.2. Гуманизированные антитела связываются с CLDN18.2, но не с CLDN18.1. IMAB362 и сCL1-1 использовали в качестве положительного контроля связывания.

Фигура 6: Профили экспрессии FACS клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки A549, неэкспрессирующие CLDN18.2 эндогенно, стабильно трансфицировали с помощью плазмиды, кодирующей CLDN18.2, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством FACS с использованием IMAB362.

Фигура 7: Окрашивание живых клеток посредством проточной цитометрии. На графике показана процентная доля выделенных отдельных клеток, связанных антителами против CLDN18.2 (сC11-1, hC11a, hC11b, hC11c, hC11f и IMAB362). Отдельные клетки выделяли из опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, развившейся из инъецированных клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (закрашенные столбики), или здорового желудка мыши, экспрессирующего CLDN18.2 (незакрашенные столбики).

Фигура 8: Окрашивание замороженной ткани желудка. Препараты замороженной здоровой ткани желудка мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (A), hC11b (B), hC11c (C), hC11f (D) или IMAB362 (E). Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фигура 9: Окрашивание замороженной опухолевой ткани, развившейся из инъецированных клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Препараты замороженной ткани опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (A), hC11f (B), IMAB362 (C) или антитела против пан-CLDN18 Abcam34H14L15. Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фигура 10: Эффект дезамидирования в отношении активности связывания IMAB362. После дезамидирования аффинность IMAB362 к CLDN18.2 снижается.

Фигура 11: Цитотоксический анализ ADC in vitro с использованием клеток НЕК-293Т-CLDN18.2, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител сC11-1 (A), сC11-2 (B) или сC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью ADC на основе IMAB362 или изотипическим контролем Ac10, конъюгированным с PNU тем же образом, или, если показано, с ADC на основе IMAB362, где токсин MMAE конъюгирован с антителом через ферментативно расщепляемый линкер MC-vc-PAB. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если

PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. Гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

Фигура 12: Цитотоксический анализ ADC in vitro с использованием клеток HEK-293T-CLDN18.1, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител сC11-1 (A), сC11-2 (B) или сC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью IMAB362 или изотипическим контролем Ac10, конъюгированным с PNU тем же образом. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные с PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. Гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

Фигура 13: Цитотоксический анализ ADC in vitro с использованием клеток ВхРС-3-CLDN18.2, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител сC11-1 (A), сC11-2 (B) или сC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью IMAB362 или изотипического контроля Ac10, конъюгированного с PNU тем же образом. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные с PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. Гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

Фигура 14: Цитотоксический анализ ADC in vitro с использованием клеток A549-CLDN18.2, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител сC11-1 (A), сC11-2 (B) или сC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью IMAB362 или изотипического контроля Ac10, конъюгированного с PNU тем же образом, или ADC на основе IMAB362, где токсин MMAE конъюгирован с антителом через ферментативно расщепляемый линкер MC-vc-PAV. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные с PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. Гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном

линкере.

**Фигура 15:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток A549-CLDN18.1, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител cC11-1 (A), cC11-2 (B) или cC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью IMAB362 или изотипического контроля Ac10, конъюгированного с PNU тем же образом, или ADC на основе IMAB362, где токсин MMAE конъюгирован с антителом через ферментативно расщепляемый линкер MC-vc-PAB. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные с PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. А гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

**Фигура 16:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток PATU-8988-S-High, где PNU конъюгирован с HC, или LC, или HC и LC химерных антител cC11-1 (A), cC11-2 (B) или cC11-3 (C). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью IMAB362 или изотипического контроля Ac10, конъюгированного с PNU тем же образом. Легенда к фигуре: ADC мечены HC-LC-PNU, если PNU конъюгирован с тяжелыми и легкими цепями антитела, мечены HC-PNU, если PNU конъюгирован только с тяжелыми цепями, и мечены LC-PNU, если PNU конъюгирован только с легкими цепями. Все ADC, конъюгированные с PNU, имеют олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый линкер. Гибкий олигопептид -GGGGS- также присутствует, если PNU конъюгирован с легкими цепями. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

**Фигура 17:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток A549-CLDN18.2, где PNU конъюгирован с LC гуманизированных антител hC11a-hC11c (A), hC11d-hC11f (B), hC11g-hC11i (C) и hC11j (D). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью ADC, где PNU конъюгирован с LC химерного антитела cC11-1 или IMAB362. Легенда к фигуре: ADC, меченые LC-PNU, содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин]. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

**Фигура 18:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток HEK-293T-CLDN18.2, где PNU конъюгирован с LC гуманизированных антител hC11a-hC11c (A), hC11d-hC11f (B), hC11g-hC11i (C) и hC11j (D). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью ADC, где PNU конъюгирован с LC химерного антитела cC11-1 или IMAB362. Легенда к фигуре: ADC, меченые LC-PNU, содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин]. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном

линкере.

**Фигура 19:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток HEK-293T-CLDN18.1, где PNU конъюгирован с LC гуманизированных антител hC11a-hC11c (A), hC11d-hC11f (B), hC11g to hC11i (C) и hC11j (D). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью ADC, где PNU конъюгирован с LC химерного антитела сC11-1 или IMAB362. Легенда к фигуре: ADC, меченые LC-PNU, содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин]. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

**Фигура 20:** Цитотоксический анализ ADC *in vitro* с использованием клеток PATU-8988-S-High ADC, где PNU конъюгирован с LC гуманизированных антител hC11a-hC11c (A), hC11d-hC11f (B), hC11g-hC11i (C) и hC11j (D). Цитотоксическую активность ADC сравнивают с цитотоксической активностью ADC, где PNU конъюгирован с LC химерного антитела сC11-1 или IMAB362. Легенда к фигуре: ADC, меченые LC-PNU, содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин]. При наличии в метке, G2 означает два глицина в олигопептидном линкере.

**Фигура 21: Эффективность *in vivo* ADC hC11a-LC-G2-PNU (A), hC11f-LC-G2-PNU (B) и hC11a(LALA)-LC-G2-PNU (C) в модели полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей желудка GXA 3037 по сравнению с ADC IMAB362-LC-G2-PNU.** Каждый ADC тестируют в дозе 0,2 мг/кг/сутки, 0,6 мг/кг/сутки или 2 мг/кг/сутки. Легенда к фигуре: все ADC содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин].

**Фигура 22: Эффективность *in vivo* ADC hC11a-LC-G2-PNU в модели полученных из пациентов ксенотрансплантатов рака толстого кишечника CXF 742 по сравнению с ADC изотипического контроля Ac10-LC-G2-PNU.** Каждый ADC тестируют в дозе 2 мг/кг/сутки. Легенда к фигуре: все ADC содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин].

**Фигура 23: Эффективность *in vivo* ADC hC11a-LC-G2-PNU (A) и hC11a(LALA)-LC-G2-PNU (B) в модели полученных из пациентов ксенотрансплантатов рака поджелудочной железы PAXF 2175 по сравнению с ADC IMAB362-LC-G2-PNU.** Каждый ADC тестируют в дозе 0,2 мг/кг/сутки или 0,6 мг/кг/сутки. Легенда к фигуре: все ADC содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин].

**Фигура 24: Эффективность *in vivo* ADC hC11a-LC-G2-PNU в модели полученных из пациентов ксенотрансплантатов рака легких LIXFC 2050 по сравнению с ADC Ac10-LC-G2-PNU изотипического контроля.** Каждый ADC тестируют в дозе 2 мг/кг/сутки. Легенда к фигуре: все ADC содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин].

**Фигура 25:** Графическое представление ADC, где PNU конъюгирован с LC

антитела через спейсерный элемент -GGGS-, олигопептидный линкерный элемент -LPQTGG- и нерасщепляемый линкерный элемент EDA, связанный с C<sub>13</sub> PNU. Легенда к фигуре: все ADC содержат PNU, конъюгированный только с легкими цепями через линкер [GGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин].

### **ПРИМЕРЫ**

#### Пример 1: Получение химерных и гуманизированных антител

Способы получения моноклональных антител хорошо известны. В The Handbook of Therapeutic Antibodies, Second Edition (2014) приведена исчерпывающая информация об этих способах, таких как получение моноклональных антител посредством иммунизации мышей или крыс (Moldenhauer, 2014), гуманизации моноклональных антител (Saldanha, 2014), биоинформатических инструментах для анализа антител (Martin and Allemn, 2014) или разработке и производстве терапевтических антител (Jacobi et al., 2014). В кратком изложении, моноклональные антитела против CLDN18.2 получали посредством ДНК-иммунизации крыс с использованием плазмиды, кодирующей кДНК CLDN18.2 человека (huCLDN18.2) (референсная последовательность NCBI: NM\_001002026.3). Специфическую реактивность сывороток крыс против huCLDN18.2 анализировали посредством проточной цитометрии (анализа FC) и ELISA. Затем из лимфоцитов, выделенных из иммунизированных крыс, получали клоны гибридом для получения химерных антител. Три клон идентифицировали как являющиеся CLDN18.2-специфическими, что приводит к получению химерных антител, названных cC11-1, cC11-2 и cC11-3, со схожими CDR (см. таблицу 3). Затем cC11-1, cC11-2 и cC11-3 гуманизировали, получая 10 гуманизированных клонов, названных антителами hC11a, hC11b, hC11c, hC11d, hC11e, hC11f, hC11g, hC11h, hC11i и hC11j (см. таблицу 3). Эти антитела также использовали для получения ADC.

В качестве контроля синтезировали антитело IMAB362 с использованием последовательностей тяжелой (SEQ ID NO:55) и легкой цепи (SEQ ID NO:56), опубликованных в WO2013/174509 и обозначенных как моноклональное антитело 182-D1106-362, регистрационный номер DSM ACC2810, депонируемое на 26 октября, 2006 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig DE.

Таблица 3: Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности антитела

НАЗВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
<b>cC11-1</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO:2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMH WVKQAPGKGLKWMGWINTYTGKPTYADDFKGR	SEQ ID NO:27

	FVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFY GYTMDAWGQGTSVTVSS	
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO:71
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgacttcaagggg	SEQ ID NO:72
HCDR3	gccgtcttctacggatatac gatggacgcg	SEQ ID NO:73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagag cgtgaagatctcgtgcaaggcgagcggatatacgttcacggactacgcgatgc actgggtcaagcaagcggcgggaaagggtgaagtggatgggggtgatca acacgtacacggggaagccgacatacgcggacgacttcaaggggcgattcgt gttctcgtggaggcgagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctcgaacctg aagaacgaggacacggcgacgtacttctgcgcgcccgtcttctacggat atac gatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtgacggctctcgagc	SEQ ID NO:74
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWY QQKSGKSPQLLIFS VKRLQDGVPSRFSGSGSGTQY SLKISGMQPEDEGDYFCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:28
LCDR1	cgggcgagcgaggacatctactcgaacctggcg	SEQ ID NO:75
LCDR2	tccgtcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO:76
LCDR3	ctgcaagggagcaacttcccgtgacg	SEQ ID NO:77
VL	gacatccagatgacgcagagccccggcgtcgtgagcgcgagcctggggga gacgatctc gatcgcgtgccgggagcggagacatctactcgaacctggcg tggtatcaacagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatcttctccgtaa gchgctgcaagacggcgtcccagccgattctcggggagcgggagcggga cgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact acttctgcctgcaagggagcaacttcccgtgacgttcgggtcgggtacaaa ctcgatcaaa	SEQ ID NO:78
<b>cII-2</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINAYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO:7
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO:8
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFTDYAMH WVKQGP GKGMKWMGWINAYTGKPTYADDFKGR	SEQ ID NO:29

	FVLSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVYY GYTMDAWGQGTSVIVSS	
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO:71
HCDR2	tggatcaacgcgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg	SEQ ID NO:79
HCDR3	gccgtctactacggatatac gatggac	SEQ ID NO:80
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagag cgtgaagatctcgtgcaagacgagcggatatacgttcacggactacgcgatgc actgggtcaagcaggggcccagggaaagggatgaagtggatgggggtgatca acgcgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaaggggcgattcgt gctgagcctggaggcgagcgcctcgacggcgaacctgcaaatctcgaaactg aagaacgaggacacggcgacgtacttctgcgcgcgggcccgtctactacggat atac gatggacgcgtgggggaggggtaccagcgtgatcgtctcgagc	SEQ ID NO:81
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO:9
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO:10
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQ QKSGKSPQLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTQYS LKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:30
LCDR1	cggacgagcaggacatctactcgaactcgcg	SEQ ID NO:82
LCDR2	tcagtcaaccggctgcaagac	SEQ ID NO:83
LCDR3	ctgcaagggagcaagttcccgtgacg	SEQ ID NO:84
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgagcctgagcgcgagcctggggga gacgatctc gatc g agt gccggacgagcaggacatctactcgaactcgcgt ggttccagcagaagagcggggaagagcccagctgctgatctactcagta ccggctgcaagacggcgtcccagccgattctcggggagcgggagcgggac gcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacaggggggacta cttctgcctgcaagggagcaagttcccgtgacgttcgggagcgggtaccaaact cgagatcaaa	SEQ ID NO:85
<b>cII-3</b>		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO:12
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO:2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMY WVKQVPGKGLRWGMWINTYTGKPTYADDFKGR	SEQ ID NO:31

	FVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFY GYTMDAWGQGTSVTVSS	
HCDR1	gactacgcgatgtac	SEQ ID NO:86
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg	SEQ ID NO:87
HCDR3	gccgtcttctacggatatac gatggacgcg	SEQ ID NO:73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagag cgtgaagatctcgtgcaaggcgagcggatatacgttcacggactacgcgatgt actgggtcaagcaagtgccggggaaggctgcgatggatggggtggatcaa cacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaaggggcgattcgtg ttctcgtggaggcgagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctcgaacctga agaacgaggacacggcgacgtacttctgcgcgcgggccgttctacggatat acgatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtgacggctcgcgac	SEQ ID NO:88
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO:13
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO:14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIA CRTSEDIYSNLAWY QQKSGKSPQLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTQYS LKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:32
LCDR1	cggacgagc gaggacatctactcgaacctggcg	SEQ ID NO:89
LCDR2	gcgatcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO:90
LCDR3	ctgcaagggagcaagttcccgtgacg	SEQ ID NO:84
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgagcctgagcgcgagcctggggga gacgatctc gatcgcgtgccggacgagc gaggacatctactcgaacctggcgt ggatcaacagaagagcggggaagagcccgcagctgctgatcttcgcatcaa gcggctgcaagacggcgtcccagccgattctcggggagcgggagcggga cgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact acttctgcctgcaagggagcaagttcccgtgacgttcgggtcgggtaccaaac tcgagatcaaa	SEQ ID NO:91
<b>hCIIa</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINTYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:15
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQ	SEQ ID NO:33



	GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLTVTVSS	
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:46
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO:71
HCDR2	tggatcaatacacacacggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga	SEQ ID NO:92
HCDR3	gcggtctctacggatatac gatggatgcc	SEQ ID NO:93
VH	caggccaactagtccaaagcggggcggaagtcaagaagcccggagcatcc gtcaaagtcagctgcaaggcgagcggatatacattacggactacgcgatgca ctgggtcaggcaagcccctgggcaaggctcgaatggatgggatggatcaat acatacacggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaaggaagagtcacaat tacgcgggatacatccgcactaccgcctacatggagctaagctcgctcggga gagagatacggcggctactattgcgcccagcggctctctacggatatacga tggatgcctggggcagggtaccctggtcacggctcgcgagc	SEQ ID NO:94
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLA WYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI K	SEQ ID NO:38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLA	SEQ ID NO:51

	YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO:95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO:96
LCDR3	ttgcaaggaagcaattcccccttgact	SEQ ID NO:97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgetgagcgcacggcggggatag agtcaccataacatgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggta tcaacaaaaaccgggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagact acaagatggagtaccgagccgatttcgggaagcgggagcgggacggatttc acgctgaccatcaagttgcaaccggaggatttgcgacatactattgcttga aggaagcaattcccccttgacttcgggcaagggtaccaaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO:98
<b>hClIb</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO:16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS	SEQ ID NO:47

	<p>DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL  TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL  PGX, X является R или K</p>	
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO:99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO:100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO:101
VH	<p>caggtccaattagtcxaaagcggggcggaagtaagaagccgggggagc  gtcaaaagtctcatgcaaaagcagcggatacacatttacggattatgcaatgcaat  gggtcaggcaagcaccggacaaggctggaatggatggatggatggattaacac  ctacacgggcaagccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataa  cgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatggatggatggattaacacctaca  cgggcaagccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgag  agacacgagcgcgagcaccgtaccctggcaccgtctcgagc</p>	SEQ ID NO:102
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW  YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD  FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI  K</p>	SEQ ID NO:38
Легкая цепь	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW  YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD  FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI  KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS  STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  GEC</p>	SEQ ID NO:51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO:95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO:96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO:97
VL	<p>gacattcaaatgacgcaaaagcccatcatcgetgagcgcacggtcggggatag  agtcaccataacatgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggta  tcaacaaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagact  acaagatggagtaccgagccgatttccgggaagcgggagcgggacggatttc</p>	SEQ ID NO:98

	acgctgaccatatacaagttgcaaccggaggattttgcgacatactattgcttgca aggaagcaatttccccttgactttcgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	
<b>hCIIc</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO:16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:47
HCDR1	gattatgcaatgac	SEQ ID NO:99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO:100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO:101
VH	caggccaattagccaagcggggcggaagcaagaagccggggcgagc gtcaaagtctcatgcaaagcgagcggatacacattacggattatgcaatgcaact gggtcaggcaagcaccggacaaggctggaatggatgggatggattaacac ctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataa cgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatgggatggattaacacctaca cgggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgag agacacgagcgcgagcaccgtaccctggcaccgtctcgagc	SEQ ID NO:102

LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO:17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO:14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:39
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	SEQ ID NO:52
LCDR1	cgaacgagcgaggacatataactcaaaccttgca	SEQ ID NO:103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO:104
LCDR3	ttgcaaggctccaaatttcccctgaca	SEQ ID NO:105
VL	gacatccaaatgactcaaagcccatcatcgctatcggcacggcggggataga gtcacgataacatgccgaacgagcgaggacatataactcaaaccttgcatggtat caacaaaagccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaagagc tgcaagacggagttccatcacgatttccgggatctggctcggggaccgatttac gctgactatatacatcgctgcaaccggaagatttgcacataactactgcttgaag gctccaaatttcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaa	SEQ ID NO:106
<b>hC11d</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO:16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS	SEQ ID NO:47

	KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	
HCDR1	gattatgcaatgca	SEQ ID NO:99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO:100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO:101
VH	caggtccaattagtcxaaagcggggcggaagcaagaagccggggcgagc gtcaaagtctcatgcaaagcagcggatacacatttacggattatgcaatgcaact gggtcaggcaagcaccggacaaggctggaatggatggatggattaacac ctacacgggcaagccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataa cgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatggatggattaacacctaca cgggcaagccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgag agacacgagcgcgagcaccgtaccctggtcaccgtctcgagc	SEQ ID NO:102
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO:18
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO:19
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWY QQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:40
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWY QQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO:53
LCDR1	cggacgagcagggatatttattcgaaactttgca	SEQ ID NO:107

LCDR2	cagtcaatcggctacaagat	SEQ ID NO:108
LCDR3	ctacaaggagcaaatccccgctgaca	SEQ ID NO:84
VL	gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgtgagcgcacatctgtcggggaccg tgacacaatcacatgccggagcagcaggatatttattcgaactttgcatggtatc aacaaaaaccgggcaaggctccgaaacttttgatttattcagtcacatcggctaca agatggcgtcccagccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacg ctgacgataatcctgctacaaccggaggacttcgcgacttattactgctacaag ggagcaaatccccgctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO:109
<b>hCIIe</b>		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO:12
HCDR2	WINTYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:15
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:35
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:48
HCDR1	gattacgcaatgtac	SEQ ID NO:110
HCDR2	tgataaatacctatacgggaaagccaacatacgccecaaaattccaaggc	SEQ ID NO:111
HCDR3	gccgtctttatggatatacgaatggacgca	SEQ ID NO:112
VH	caggtccaactgtccaatcgggggctgaagtcaaaaagccgggggagcagc	SEQ ID NO:113

	gtcaaagtcagctgcaaagcatcgggatacacatttacggattacgcaatgtact gggtcaggcaagcaccggccaacgactggaatggatgggctggataaatac ctatacgggaaagccaacatacgeccaaaaattccaaggccgcgtcacaataa cgcgggacacgagcgcacgacggcttatatggaactatcatcgctgcgatcg gaagacacggcggtctattattgcgcacgcgccgtctttatggatatac gatgg acgcatgggggcagggtaccctggtcacggctcgcgac	
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI K	SEQ ID NO:38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO:51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO:95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO:96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttcccccttgact	SEQ ID NO:97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgctgagcgcacggcgggatag agtcaccataacatgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggta tcaacaaaaaccggggaaggetccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagact acaagatggagtaccgagccgatttctgggaagcgggagcgggacggatttc acgctgaccatataagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgcttga aggaagcaatttcccccttgacttctgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO:98
<b>hCIIf</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA	SEQ ID NO:36



	MHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:49
HCDR1	gactacgcaatgcac	SEQ ID NO:114
HCDR2	tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO:115
HCDR3	gccgtctctatggatatacatgatggatgct	SEQ ID NO:116
VH	caggtccaattggtccaagcggggcggaggtaagaagccgggggcgagc gtcaaagtctcatgcaaggcaagcggatatacatctacggactacgcaatgcac tgggtccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatggatggattaatgc ctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgatta cgcgggatactagcgcgagcaccgcatataggagctaagctcgctcgatct gaggataaccgctgtatactactgcgcgagagccgctctctatggatatacatgg atgcttgggggcagggtaccctggtcacggctctcgagc	SEQ ID NO:117
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI K	SEQ ID NO:41

Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO:54
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaacttgct	SEQ ID NO:118
LCDR2	agcgtcaaaaggctccaagac	SEQ ID NO:119
LCDR3	ctacaaggctctaactcccattgaca	SEQ ID NO:120
VL	gatatccaaatgacgcaatcacatctagcctatcgccctctgtgggggaccga gtcacatcacatgccgagcttcggaggacatctatagcaacttgcttggtatc aacaaaagccggggaaagcaccaaaagctgctgatataagcgtcaaaaggct ccaagacggagtccaagccgattctcgggctccggctccgggacggatttta cgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactattgectaca aggctctaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO:121
<b>hC11g</b>		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO:1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO:3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:36
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAV FYGYTMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	SEQ ID NO:49

	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	
HCDR1	gactacgcaatgcac	SEQ ID NO:114
HCDR2	tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO:115
HCDR3	gccgtcttctatggatatacatgatggatgct	SEQ ID NO:116
VH	caggccaattggccaagcggggcggaggtaagaagccggggcgagc gtcaagtctcatgcaaggcaagcggatatacatctacggactacgcaatgcac tgggtccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatggatggattaatgc ctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgatta cgcgggatactagcgcgagcaccgcatatatggagctaagctcgtcgcgatct gaggataccgctgtatactactgcgcgagagccgtcttctatggatatacatgatg atgcttggggcagggtaccctggtcacggctcgcgac	SEQ ID NO:117
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO:18
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO:19
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWY QQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:40
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWY QQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO:53
LCDR1	cggacgagcgaggatatttattcgaacttgca	SEQ ID NO:107
LCDR2	cagtcaatcggtacaagat	SEQ ID NO:108
LCDR3	ctacaaggagcaaaattcccgtgaca	SEQ ID NO:84
VL	gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgtgagcgcacatctgctggggaccg tgtcacaatcacatgccggacgagcaggatatttattcgaacttgcatggtatc aacaaaaaccgggcaaggctccgaaactttgatttattcagtcaatcggtaca agatggcgtcccagccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacg	SEQ ID NO:109

	ctgacgatacatcgctacaaccggaggacttcgcgacttattactgcctacaaggagacaaattcccgctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa	
<b>hCIIh</b>		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO:12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO:8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV YYGYTMDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV YYGYTMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:50
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO:122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaagga	SEQ ID NO:123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO:124
VH	caggccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagcccggagcatccgt caaagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgg gtccggcaagccccggacaacggctggaatggatggatggattaatgccta caccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaaggaagggtcacgattacgc gggacacgagcgcctcaaccgcatacatggagctatcgagcctgcgaagcga ggacaccgcggtctactactgcgcgcgggcggtctactatggatatac gatgg acgcatgggggcagggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO:125

LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI K	SEQ ID NO:41
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	SEQ ID NO:54
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaacttgct	SEQ ID NO:118
LCDR2	agcgtcaaaaggctccaagac	SEQ ID NO:119
LCDR3	ctacaaggctctaacttcccattgaca	SEQ ID NO:120
VL	gatatccaaatgacgcaatcaccatctagcctatcggcctctgtggggaccga gtcaccatcacatgccgagcttcggaggacatctatagcaacttgcttggtatc aacaaaagccgggaaagcaccaaaagctgctgatatatagcgtcaaaaggct ccaagacggagtccaagccgattctcgggctccggctccgggacggatttta cgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactattgcctaca aggctctaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO:121
<b>hCII</b>		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO:12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO:8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV YYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV	SEQ ID NO:50

	YGYTMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	
HCDR1	gactacgctatgat	SEQ ID NO:122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaagga	SEQ ID NO:123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO:124
VH	caggccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatecgt caaagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgg gtcggcaagccccggacaacggctggaatggatggatggattaatgcta caccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaaggaagggtcacgattacgc gggacacgagcgcctcaaccgcatacatggagctatcgagcctgcgaagcga ggacaccgcggtctactactgcgcggggcgggtctactatggatatac gatgg acgcatgggggcagggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO:125
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO:4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO:5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO:6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI K	SEQ ID NO:38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAW YQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR	SEQ ID NO:51

	GEC	
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO:95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO:96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttcccccttgact	SEQ ID NO:97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgtgagcgcacggctcggggatag agtcaccataacatgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggta tcaacaaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagact acaagatggagtaccgagccgatttctgggaagcgggagcgggacggatttc acgctgaccatataagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgcttgea aggaagcaatttcccccttgacttctgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO:98
<b>hCIIj</b>		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO:12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO:20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO:8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV YYGYTMDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO:37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYA MYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQ GRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAV YYGYTMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGX, X является R или K	SEQ ID NO:50
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO:122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaagga	SEQ ID NO:123

HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO:124
VH	cagggtccaactggttcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatecgt caaagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgg gtccggcaagccccggacaacggctggaatggatggatggattaatgcta caccgggaagccgacttatgccaaaaattcaaggaagggtcacgattacgc gggacacgagcgcctcaaccgcatacatggagctatcgagcctgcgaagcga ggacaccgcggtctactactgcgcgcgggcggtctactatggatatac gatgg acgcatgggggcagggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO:125
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO:17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO:14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO:11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:39
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWY QQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	SEQ ID NO:52
LCDR1	cgaacgagcgaggacataactcaaaccttgca	SEQ ID NO:103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO:104
LCDR3	ttgcaaggctccaaatttcccctgaca	SEQ ID NO:105
VL	gacatccaaatgactcaaagcccatcatcgctatcggcacggctggggataga gtcacgataacatgccgaacgagcggagacataactcaaaccttgcatggtat caacaaaagccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaagagge tgcaagacggagttccatcacgatttccggatctggctcggggaccgatttac gctgactatatcatcgctgcaaccggaagatttgcacatactactgcttgaag gctccaaatttcccctgacattcggacaaggtaccaaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO:106

Антитела, дополнительно описанные в примерах 2-5, модифицировали так, чтобы они содержали метку LPQTGG (SEQ ID NO:131) на С-конце HC и/или метку GGGSLPQTGG (SEQ ID NO:132) на С-конце LC. С-концевой лизин (K) на HC в этом случае заменяли Arg (R) из метки. Добавление меток не изменяло аффинность и специфичность антител к CLDN18.2.



Пример 2: Анализ ELISA и титрование FC для подтверждения связывания с CLDN18.2 химерных и гуманизированных вариантов антител

Аффинность связывания с CLDN18.2 химерных и гуманизированных антител (hCl) тестировали посредством анализа ELISA с использованием липочастиц, несущих CLDN18.2, в качестве источника антигена. CLDN18.2-липочастицы и нуль-липочастицы (без связанных антигенов, в качестве отрицательного контроля) использовали для покрытия 96-луночных планшетов в конечной концентрации 10 ед./мл. После промывки PBS/0,05% Tween-20 (PBS-T) и блокирования с помощью PBS-T/3% BSA в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C серийные разведения 1:3 тестируемых антител с начальной концентрацией 2 мкг/мл добавляли в покрытые лунки и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C. Наличие связанных антител выявляли посредством связывания HRP-конъюгированного вторичного антитела козы против человека и проявки с помощью SIGMAFAST™ OPD в качестве субстрата пероксидазы и останавливали реакцию посредством добавления 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с последующим считыванием OD при 490 нм на спектрофотометре для чтения планшетов для ELISA. Типичные кривые связывания показаны на фигуре 1. Все тестируемые антитела по изобретению специфически связываются с CLDN18.2-содержащими липочастицами. Примечательно, что гуманизация химерного антитела приводила не к снижению аффинности, чего можно было бы ожидать, а даже к повышению аффинности у 6 из 10 антител по сравнению с родительским химерным антителом cC11-1.

Связывание химерных и гуманизированных антител против CLDN18.2 также тестировали посредством титрования FC с использованием клеток PA-TU-8988S (Creative Bioarray, кат. № CSC-C0326) и клеток HEK293T (ATCC, CRL-3216™), гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Титрование FC позволяет измерять полумаксимальную эффективную концентрацию (EC<sub>50</sub>) тестируемых антител. Клетки PA-TU-8988S, экспрессирующие высокие уровни CLDN18.2, выбирали посредством FACS. В настоящем описании эти клетки обозначают как клетки PA-TU-8988S-High. Учитывая окрашивание FACS с помощью IMAB362, популяция клеток PA-TU-8988S экспрессирует разные уровни CLDN18.2 с высоким и средним уровнем экспрессии (см. фигуру 2A). Для получения более гомогенной популяции клеток, клетки сортировали посредством FACS для селекции только клеток с более высокой экспрессией CLDN18.2. В кратком изложении, клетки PA-TU-8988S, суспендированные в буфере для FACS (PBS, 2% FCS), инкубировали на льду в течение 30 мин с IMAB362 в количестве 2 мкг/мл. После промывки в буфере для FACS клетки инкубировали с PE-меченым Fcγ-специфическим вторичным антителом IgG козы против человека (eBioscience) на льду в течение 30 мин. После промывки окрашенные клетки ресуспендировали в буфере для FACS, анализировали и сортировали с помощью устройства FACSAria™, отделяя клетки со средней экспрессией от клеток с высокой экспрессией (фигура 2B). После сортировки собранные клетки PA-TU-8988S-High ресуспендировали в средах для выращивания, подвергали экспансии и замороженные аликвоты сохраняли в жидком N<sub>2</sub>. Клетки

НЕК293Т, гиперэкспрессирующие CLDN18.2 или CLDN18.1, получали, как описано в примере 3, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством проточной цитометрии (фигура 3).

Для количественного анализа связывания антител с CLDN18.2  $250 \times 10^3$  клеток/лунку клеток НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, или клеток PA-TU-8988-High высевали в буфер для FC (PBS/2% FBS) в 96-луночные планшеты и осаждали посредством центрифугирования. Антитела IMAB362 и hCl, подлежащие тестированию, разводили до 20 мкг/мл с последующими серийными разведениями 1:4 и инкубировали с высеянными клетками в течение 30 мин при 4°C. PE-конъюгированное вторичное антитело против IgG человека добавляли к клеткам еще на 30 мин при 4°C после промывок буфером для FC с последующими дополнительными промывками буфером для FC. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для FC и измеряли с помощью клеточного анализатора FACSCalibur™ (BD Biosciences, USA). Анализ FC (см. фигуру 5 и таблицу 4) показал, что антитела hCl имеют более высокое значение EC<sub>50</sub>, чем IMAB362, хоть и имеют значение maxMFI в том же диапазоне, что и IMAB362. Схожие значения maxMFI могут свидетельствовать о схожих скоростях прямой/обратной реакции в IMAB362 и антител hCl.

Таблица 4: Максимальная MFI и EC<sub>50</sub> (мкг/мл), измеренные для всех антител hCl и IMAB362, на линиях клеток НЕК293Т, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, и линиях клеток PA-TU-8988S-High.

Антитело	НЕК293Т-CLDN18.2		PA-TU-8988S-High	
	Max MFI	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	Max MFI	EC <sub>50</sub> (мкг/мл)
IMAB362	1968	0,3878	1046	0,5082
hCl1a	1879	0,5976	1649	2,431
hCl1b	1859	0,5715	1724	1,984
hCl1c	1233	0,7531	1048	1,472
hCl1d	1642	0,5411	1530	1,933
hCl1e	1935	0,5583	1862	2,241
hCl1f	1721	0,7948	1602	2,144
hCl1g	1438	0,6779	1254	1,77
hCl1h	2076	0,4325	1949	1,75
hCl1i	2175	0,4437	2087	1,231
hCl1j	1848	0,4081	1705	1,157

Пример 3: Получение пре-В-клеток L11, клеток ВхРС-3 и клеток НЕК293Т, стабильно экспрессирующих hCLDN18.1 и hCLDN18.2; тестирование специфичности связывания химерных и гуманизированных антител.

Линия пре-В-клеток L11 (Waldmeier et al., 2016), линия клеток ВхРС-3 (ATCC CRL-1687™), линия клеток НЕК293Т (ATCC CRL-3216™) и линия клеток А549 (ATCC

CCL-185<sup>TM</sup>) не экспрессируют CLDN18.1 или CLDN18.2 эндогенно. Таким образом, для тестирования связывания антитела CLDN18.1 или CLDN18.2 рекомбинантно гиперэкспрессировали в линиях клеток HEK293T и A549. Клетки котрансфицировали посредством электропорации с использованием транспозаза-экспрессирующей конструкции (pCDNA3.1-hy-mPB), конструкции, несущей транспозируемый полноразмерный huCLDN18.1 (pPB-Puro-huCLDN18.1) или huCLDN18.2 (pPB-Puro-huCLDN18.2) вместе с кассетой резистентности к пурамицину, и конструкции, несущей EGFP в качестве контроля трансфекции (pEGFP-N3) (Waldmeier et al., 2016). После электропорации клеткам позволяли восстанавливаться в течение двух дней в средах для выращивания при 37°C во влажной камере в атмосфере 7,5% CO<sub>2</sub> в случае клеток L11 и атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в случае клеток HEK293T и A549. Трансфекцию подтверждали посредством анализа FC экспрессии EGFP. Затем клетки, экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2, подвергали селекции посредством добавления пурамицина в культуру в количестве 1 мкг/мл и подвергали дополнительной экспансии для получения замороженных стоков в FCS с 10% DMSO. Экспрессию CLDN18.1 и CLDN18.2 в трансфицированных клетках анализировали посредством FC (см. фигуру 3). В кратком изложении, трипсинизированные клетки HEK293T, клетки A549 и клетки L11, выращенные в суспензии, собирали посредством центрифугирования, ресуспендировали в PBS/2% FCS и окрашивали на CLDN18.2 с использованием IMAB362 в качестве первичного антитела в количестве 2 мкг/мл на льду в течение 30 мин и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. После дополнительной промывки ресуспендированные окрашенные клетки в ледяном буфере для FC анализировали с использованием устройства FACSCalibur<sup>TM</sup> (см. фигуру 4 и фигуру 5). Нетрансфицированные родительские клетки, неэкспрессирующие CLDN18.2, использовали в качестве отрицательного контроля. Экспрессию CLDN18.1 анализировали аналогичным образом, с использованием собственного антитела против пан-CLDN18, распознающего CLDN18.1 и CLDN18.2 (см. фигуру 3). Также будет подходить любое антитело против пан-CLDN18, которое можно использовать для измерения посредством проточной цитометрии, такое как антитело против клаудина-18/CLDN18 (C-конец), поставляемое OriGene Technologies (кат. № AP50944PU-N), pAb кролика против CLDN18 (C-конец) от MyBioSource (кат. № MBS8555451) или антитело против CLDN18 от ProSci (кат. № 63-847).

Таким образом, клетки L11 и HEK293T, стабильно экспрессирующие huCLDN18.1 и huCLDN18.2, использовали для тестирования специфичности связывания химерных антител cC11-1, cC11-2, cC11-3 и гуманизированных антител с CLDN18.2, но не CLDN18.1. Клетки окрашивали на льду в течение 30 мин с использованием антител в количестве 2 мкг/мл и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. Все три химерных антитела (фигура 4) и

гуманизированные антитела (фигура 5) связываются с huCLDN18.2, экспрессируемым клетками L11 или HEK293T, но не с huCLDN18.1. Кроме того, гуманизированные антитела связываются с huCLDN18.2 с аффинностью, схожей с IMAV362, и с по меньшей мере такой же хорошей аффинностью, что и cC11-1 (фигура 5).

Пример 4: Тестирование связывающей активности гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством проточной цитометрии на живой опухолевой ткани и живой ткани желудка

Линия клеток A549 (ATCC CCL-185<sup>TM</sup>) не экспрессирует CLDN18.1 или CLDN18.2 эндогенно. Для тестирования связывания антитела с CLDN18.2, CLDN18.2 экспрессировали в клетках A549. Клетки A549 котрансфицировали посредством электропорации с помощью транспозаза-экспрессирующей конструкции (pCDNA3.1-hy-mPB) (Klose et al., 2017), конструкции, несущей транспозируемый полноразмерный huCldn18.2 (pPB-Puro-huCldn18.1) вместе с экспрессирующей кассетой пурамицина, и конструкции, несущей EGFP в качестве контроля трансфекции (pEGFP-N3) (Waldmeier et al., 2016). После электропорации клеткам позволяли восстанавливаться в течение двух дней в средах для выращивания при 37°C во влажной камере в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Трансфекцию проверяли посредством анализа FC экспрессии EGFP. Затем клетки, экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2, подвергали селекции посредством добавления пурамицина в культуру в количестве 1 мкг/мл и подвергали дополнительной экспансии для получения замороженных стоков в FCS с 10% DMSO. Экспрессию CLDN18.2 в трансфицированных клетках анализировали посредством FC. В кратком изложении, трипсинизированные клетки A549 собирали посредством центрифугирования, ресуспендировали в PBS/2% FCS и окрашивали на CLDN18.2 с использованием IMAV362 в качестве первичного антитела в количестве 2 мкг/мл на льду в течение 30 мин и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) в количестве 2,5 мкг/мл (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. После дополнительной промывки ресуспендированные окрашенные клетки в ледяном буфере для FC анализировали с использованием устройства FACSCalibur<sup>TM</sup> (см. фигуру 6). Нетрансфицированные родительские клетки, неэкспрессирующие CLDN18.2, использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки депонированы на 6 декабря 2019 года в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig DE и доступны под регистрационным номером DSM ACC3360.

Двум мышам Balb/c подкожно имплантировали  $1 \times 10^6$  клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, в 100 мкл 50% матригеля и рост опухолей подвергали мониторингу в течение нескольких недель до достижения опухолью желаемого размера 150-450 мм<sup>3</sup>. Здоровую ткань желудка и опухолевую ткань собирали для анализа FC. Собранные ткани нарезали на небольшие фрагменты и расщепляли с помощью набора для диссоциации опухоли Miltenyi (MACS MiltenyiBiotec, Germany). Фрагменты опухолей инкубировали с буфером для диссоциации (полученным по инструкциям производителя) в

6-луночных планшетах в течение 30 мин при 37°C и постоянном осторожном встряхивании. Образцы ресуспендировали и пропускали через клеточное сито 70 мкм (Corning, USA) с последующей промывкой 20 мл буфера для FC (PBS+2% FBS). Центрифугировали суспензии клеток (5 мин при 400×g и 4°C) и выбрасывали супернатанты. При необходимости, суспензии клеток пропускали через сито, повторно центрифугировали и ресуспендировали осадки в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, USA), инкубировали на льду в течение 4 мин. После инкубации добавляли 25 мл PBS и суспензии снова центрифугировали (5 мин при 400×g и 4°C). Осадки ресуспендировали в буфере FC (0,5-3 мл с учетом осадка). Равное количество клеток переносили в 96-луночные планшеты и дополнительно обрабатывали для анализа FC. Клетки в планшетах промывали PBS и центрифугировали (при 400×g в течение 2 мин при 4°C). Осадки ресуспендировали в 50 мкл/лунку смеси для окрашивания, состоящей из выбранного антитела (сC11-1, hC11a, hC11b, hC11c и hC11f в количестве 4 мкг/мл; IMAB364 в количестве 2 мкг/мл) и AF488-меченого антитела против пан-цитокератина AE1/AE3 (Thermo Fisher Scientific, USA), разведенного в PBS, и инкубировали в течение 25 мин на льду. После инкубации клетки промывали дважды в PBS и центрифугировали (при 400×g в течение 2 мин при 4°C). Осадки ресуспендировали в 50 мкл/лунку смеси для вторичного окрашивания (PBS+PE-меченое антитело против человека) (Thermo Fisher Scientific, USA) и инкубировали в течение 25 мин на льду. После инкубации клетки снова промывали дважды в PBS. Осадки ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащем DAPI. Планшеты держали на льду до анализа FC. Для анализа FC живые клетки отделяли от погибших клеток с помощью прямого светорассеяния и окрашивания DAPI. Затем живые клетки гейтировали по наличию цитокератина (AF888-положительные) и связанных антител против CLDN18.2 (PE-положительные клетки). Результаты анализ FC можно видеть на фигуре 7 и в таблице 5. Результаты представляют собой средние данные, полученные для двух мышей.

Все тестируемые антитела (сC11-1, hC11a, hC11b, hC11c, hC11f и IMAB364) связывались со схожей процентной долей опухолевых клеток, несущих CLDN18.2, приблизительно от 20% до 30%. Однако, неожиданно, только IMAB362 связывалось со здоровыми клетками желудка, несущими CLDN18.2, в то время как связывание сC11-1, hC11a, hC11b, hC11c и hC11f было едва детектируемым - связывание менее 1% здоровых клеток желудка. Различие связывающей способности между CLDN18.2-экспрессирующими опухолевыми клетками, происходящими из инъецированных клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, и здоровыми клетками желудка также выражали как соотношение % положительных опухолевых клеток и % положительных клеток желудка (см. последний столбец в таблице 5). Это соотношение составляло менее 5 и в среднем близко к 1 для IMAB362 и выше 15, в среднем выше 30 для тестируемых гуманизированных клонов сC11-1 (hC11a, hC11b, hC11c и hC11f).

Таблица 5: Данные FC о связывании и соотношении связывания выбранных антител со здоровыми клетками желудка и опухолевыми клетками.

	% положительных опухолевых клеток			% положительных здоровых клеток желудка			Соотношение опухоль/желудка		
	Мышь 1	Мышь 2	Среднее	Мышь 1	Мышь 2	Среднее	Соотношение для мыши 1	Соотношение для мыши 2	Соотношение для среднего значения
<b>cCl1-1</b>	37	15	26	0,4	0,3	0,35	92,5	50	74,3
<b>hCl1a</b>	34	18	26	1,2	0,3	0,75	28,3	60	34,7
<b>hCl1b</b>	43	17	30	1	0,13	0,565	43	130,7	53,1
<b>hCl1c</b>	29	8	18,5	0,1	0,4	0,25	290	20	74
<b>hCl1f</b>	32	14	23	0,04	0,1	0,07	800	140	328,6
<b>IMAB362</b>	33	11	22	13	37	25	2,53	0,29	0,88

Таким образом, cCl1-1 и тестируемые гуманизированные клоны cCl1-1 (hCl1a, hCl1b, hCl1c и hCl1f) демонстрировали повышенное связывание с опухолевыми клетками относительно здоровых клеток желудка и, таким образом, являются опухолеспецифическими антителами против CLDN18.2. В отличие от этого, IMAB362 не позволяет различать опухолевые клетки, несущие CLDN18.2, и здоровые клетки желудка, несущие CLDN18.2.

Пример 5: Тестирование гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством иммуногистохимии (ИНС) на замороженных образцах ткани

Свежие образцы желудка и опухолевой ткани, экспрессирующие CLDN18.2 и полученные из мышей Balb/c, которым подкожно имплантировали  $1 \times 10^6$  клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, быстро замораживали в OCT в подходящей форме для ткани. Тканевые срезы толщиной 5-15 мкм нарезали с помощью криостата при  $-20^\circ\text{C}$ , переносили на предметное стекло при комнатной температуре (RT), а затем держали замороженным до окрашивания ИНС. Перед окрашиванием стекла переносили обратно в RT и фиксировали предварительно охлажденным ацетоном ( $-20^\circ\text{C}$ ) в течение 10 мин. После испарения ацетона при RT стекла промывали TBS и обрабатывали для блокирования неспецифических участков окрашивания: препараты инкубировали в 0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  в течение 15 мин при RT с последующими промывками TBS и инкубацией в пероксидаза-блокирующем растворе (Agilent, USA) в течение 60 мин при RT. После блокирования препараты обрабатывали для окрашивания антителами: препараты инкубировали с первичными антителами (hCL1a, hCl1b, hCl1c, hCl1f, IMAB362 и антителом против пан-CLDN18 34H14L15 (Abcam, USA)) в течение 120 мин при RT,

промывали TBS с последующей инкубацией с HRP-конъюгированным антителом против человека (или против антитела кролика в случае антитела против пан-CLDN18) в течение 30 мин при RT. Связывание антитела с CLDN18.2 или пан-CLDN18 на тканевых срезах выявляли посредством обработки препаратов хромогенной системой субстрата DAB+ (Agilent, USA) по инструкциям производителя. После последующих промывок TBS препараты докрашивали гематоксилином, промывали dH<sub>2</sub>O в течение 15 мин, дегидратировали в последовательных промывках 95% и 100% этанолом с последующей очисткой препаратов в ксилене. И наконец, препараты закрывали покровным стеклом в глицериновой заливочной среде (Agilent, USA). Типичные микроскопические изображения окрашивания здоровой ткани желудка мыши и опухолевой ткани мыши можно найти на фигуре 8 и фигуре 9, соответственно.

На фигуре 8 показано типичное окрашивание здоровой ткани желудка. В ткани, совместно окрашенной только hCL1a, hCL1b, hCL1c и hCL1f (соответственно, панели A, B, C и D), видимым является только окрашивание ядер гематоксилином, в то время как ткань, совместно окрашенная IMAB362 (панель E), демонстрирует мембранной окрашивание CLDN18.2 DAB. Таким образом, тестируемые гуманизированные клоны cCL1-1 (hCL1a, hCL1b, hCL1c и hCL1f) не связываются со здоровой тканью желудка, экспрессирующей CLDN18.2, в отличие от IMAB362, связывающегося со здоровой тканью желудка, экспрессирующей CLDN18.2. Кроме того, на фигуре 9 показано типичное окрашивание опухолевой ткани, панель A, B, C и D являются типичным изображением опухолевой ткани, окрашенной hCL1a, hCL1f, IMAB362 и антителом против пан-CLDN18 Abcam34H14L15, соответственно. Все опухоли, окрашенные тестируемыми антителами, демонстрируют сильное мембранное окрашивание CLDN18.2 DAB. Тестируемые гуманизированные клоны cCL1-1 (hCL1a и hCL1f) связывались с опухолевой тканью мыши, экспрессирующей CLDN18.2, аналогично IMAB362 или антителу против пан-CLDN18. Таким образом, гуманизированные клоны cCL1-1 демонстрируют повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью желудка, экспрессирующей CLDN18.2.

Пример 6: Анализ склонности к Asn-дезамидированию и Asp-изомеризацию вариантов гуманизированного антитела (hCl) и IMAB362

Дезамидирование остатков Asn (N) и изомеризация остатков Asp (D) может происходить во время производства, хранения или клинического использования биофармацевтических средств (*in vivo*). Дезамидирование и изомеризация могут приводить к потенциальным изменениям структуры, функции, активности, стабильности и иммуногенности белка. Таким образом, их необходимо минимизировать и контролировать, особенно в нормативном контексте. Наличие мотивов дезамидирования Asn и изомеризации Asp можно анализировать *in silico*. Наиболее распространенным мотивом дезамидирования Asn является мотив NG, и а наиболее распространенным мотивом Asp-изомеризации является мотив DG.

Такой анализ *in silico* показал, что все антитела hCl имели потенциальный мотив

Asp-изомеризации DG во 2-ой CDR VL, и ни одно из антител hCl или IMAB362 не имело потенциальных мотивов дезамидирования NG в своих CDR. Для проверки прогнозирования *in silico* антитела hCl и IMAB362 подвергали стрессовому воздействию при высоком pH или низком pH и нагреванию для ускорения модификации, которая может возникнуть при производстве и длительном хранении. В кратком изложении, образцы антител подвергали замене буфера с использованием центрифужных фильтров Amicon на 20 mM буфер фосфата натрия, pH 8,0, для стрессового тестирования Asn-дезамидирования или 20 mM цитратного буфера, pH 5,5, для стрессового тестирования Asp-изомеризации, и образцы разводили до конечной концентрации 3,0 мг/мл. 30 мкл образца инкубировали в течение 1 недели (Asn-дезамидирование) или 2 недель (Asp-изомеризация) при 40°C в термоблоке с нагреваемой противоконденсационной крышкой. Подвергнутые стрессу и неподвергнутые стрессу образцы хранили при -80°C. Asn-дезамидирование и Asp-изомеризация образцов анализировали посредством хроматографии с сильным катионным обменом (SCX). Дезамидирование Asn приводит к получению хроматограммы SCX с повышением площади пика перед основным пиком (bM), в то время как Asp-изомеризация приводит к получению хроматограммы SCX с повышением площади пика после основного пика (aM) (Du et al., 2012). Хроматографию SCX осуществляли на колонке MAbPac SCX-10 (ThermoFisher Scientific, Basel, CH) с буфером А при pH 4,0 и буфером В при pH 11,0. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин с градиентом pH 30-80% буфера В. 10 мкг образца в 20 мкл буфера А вводили в колонку. Детекцию образца осуществляли по поглощению белка при 280 нм. Антитела hCl демонстрировали только повышение bM приблизительно 27,9-32,2% (см. таблицу 6), что не классифицировали как критическое. Однако IMAB362 демонстрировало выраженное повышение bM 40,9% (см. таблицу 6), несмотря на то, что это антитело не имеет мотив NG в переменных доменах. В отличие от моноклональных антител против CLDN18.2 по изобретению, IMAB362 имеет два мотива NS в положениях CDR3 HC (аминокислоты 103-104) (SEQ ID NO:55) и CDR1 LC (аминокислоты 31-32) (SEQ ID NO:56). Мотивы NS являются вторыми по частоте мотивами для дезамидирования.

**Таблица 6:** Стрессовый тест дезамидирования mAb, хроматография с сильным катионным обменом (SCX)

<b>mAb</b>	<b>Стресс Да (+)/нет(-)</b>	<b>Доля bM (%)</b>	<b>Повышение доли bM после стрессового теста (%)</b>
hCl1a	-	20,9	27,9
	+	48,8	
hCl1b	-	19,7	29,1
	+	48,8	
hCl1c	-	19,4	31,2
	+	50,6	



hCl1d	-	18,2	32,2
	+	50,4	
hCl1e	-	21,4	28,1
	+	49,5	
hCl1f	-	18,7	28,9
	+	47,6	
hCl1g	-	18,8	28,6
	+	47,4	
hCl1h	-	17,5	31,6
	+	49,1	
hCl1i	-	20,5	30,0
	+	50,5	
hCl1j	-	20,2	30,0
	+	50,2	
IMAB362	-	26,0	40,9
	+	66,9	

Влияние стрессового теста Asn-дезамидирования на аффинность связывания с CLDN18.2 hCl1a, hCl1i и IMAB362 тестировали посредством анализа ELISA с использованием липочастиц, несущих CLDN18.2, в качестве источника антигена. CLDN18.2-липочастицы и нуль-липочастицы (без антигенов) использовали для покрытия 96-луночных планшетов при конечной концентрации 10 ед./мл в 100 мМ карбоната натрия, pH 9,6. После промывки PBS/0,05% Tween-20 (PBS-T) и блокирования с помощью PBS-T/3% BSA в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C, добавляли серийные разведения 1:3 антител hCl с начальной концентрацией 2 мкг/мл и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C. Наличие связанных антител выявляли по связыванию HRP-конъюгированного вторичного антитела козы против человека, проявляли с помощью Sigma-Fast OPD в качестве субстрата пероксидазы, реакцию останавливали посредством добавления 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывание осуществляли при OD-490 с помощью спектрофотометра для чтения планшетов для ELISA. Значение EC<sub>50</sub> IMAB362 было в 1,8 раз выше после стрессового теста дезамидирования (неподвергнутый стрессу референс: EC<sub>50</sub> 51,5нг/мл, подвергнутый стрессу: EC<sub>50</sub> 95,09 нг/мл) (см. фигуру 10). Это может быть связано с повышением bM 40,9% при SCX после стрессового теста дезамидирования (см. таблицу 6). Подтверждая результаты SCX в отношении Asn-дезамидирования, не наблюдали значимых различий связывания антигена после стрессового теста дезамидирования hCl1a и hCl1i (см. таблицу 6). Таким образом, стрессовый тест дезамидирования показал, что антитела hCl менее склонны к дезамидированию и потенциально сниженному связыванию мишени, чем IMAB362, и

являются прогнозируемо более стабильными во время производства, хранения и клинического использования (*in vivo*), что приводит к получению более однородного и активного антитела/продукта.

Хотя все антитела hCl имели потенциальный мотив Asp-изомеризация DG во 2-ой CDR VL и в домене CH2 и CH3 HC (VL- CDR2 (в положении 62), CH2 (в положении 282), CH3 (в положении 403)), с помощью стрессового теста Asp-изомеризации не выявили Asp-изомеризацию (см. таблицу 7) в отличие от прогнозируемого из Du et al (Du et al., 2012). Значения аМ неподвергнутых стрессу образцов (за исключением IMAV362) являлись уже значимо высокими. Это может являться результатом вариантов тяжелой цепи с лизиновым клиппированием. IMAV362 являлось единственным антителом без высокой аМ в неподвергнутом стрессу образце. IMAV362 являлось единственным тестируемым антителом против CLDN18.2 без С-концевого Lys, что позволяет предполагать, что в случае антител hCl клиппирование С- концевое Lys является наиболее вероятной причиной повышенной аМ в неподвергнутых стрессу и подвергнутых стрессу образцах.

**Таблица 7:** Стрессовый тест Asp-изомеризации mAb, хроматография с сильным катионным обменом (SCX)

<b>mAb</b>	<b>Стресс Да (+)/нет(-)</b>	<b>Доля аМ (%)</b>	<b>Повышение доли аМ после стрессового теста (%)</b>
<b>hCl1a</b>	-	45,1	-6,5
	+	38,6	
<b>hCl1b</b>	-	45,2	-5,7
	+	39,5	
<b>hCl1c</b>	-	40,3	-2,3
	+	38,1	
<b>hCl1d</b>	-	41,3	-4,6
	+	36,7	
<b>hCl1e</b>	-	44,4	-4,2
	+	40,2	
<b>hCl1f</b>	-	43,5	-1,8
	+	41,7	
<b>hCl1g</b>	-	44,5	-6,4
	+	38,0	
<b>hCl1h</b>	-	43,2	-4,7
	+	38,5	

<b>hClIi</b>	-	44,1	-4,6
	+	39,5	
<b>hClIj</b>	-	43,7	-7,7
	+	36,0	
<b>IMAB362</b>	-	1,5	4,1
	+	5,6	

Пример 7: Конъюгация mAb с глицин-модифицированным токсином для получения ADC с использованием сортаза-опосредованной конъюгации.

Фермент сортаза А: Рекомбинантный и аффинно очищенный фермент сортаза А из *Staphylococcus aureus* продуцировали в *E. coli*, как описано в WO2014140317 A1.

Получение глицин-модифицированных токсинов: биглицин-модифицированное производное EDA-антрациклин GG-EDA-PNU-159682 (также см. фигуру 25) произведено Levena Biopharma, San Diego, USA. Токсин PNU-159682 синтезировали так, чтобы он уже включал нерасщепляемый линкер EDA и олигопептидный линкер GG. Идентичность и чистоту глицин-модифицированного токсина подтверждали посредством масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Глицин-модифицированные токсины демонстрировали чистоту >95%, что определяли посредством хроматографии ВЭЖХ.

Сортаза-опосредованная конъюгация антитела: указанные выше токсины конъюгировали с тяжелой цепью и легкой цепью или только легкой цепью LPQTG-меченых антител против CLDN18.2, как указано в таблице 3, и сравнительными антителами (IMAB362, CD30-специфическим антителом AC10). Альтернативно, токсины конъюгировали только с легкой цепью антител. Антитела конъюгировали с токсинами посредством инкубации тяжелых и легких цепей или только легких цепей LPQTG-меченых mAb в количестве 20 мкМ с глицин-модифицированным токсином в количестве 100 мкМ и сортазой А в количестве 4 мкМ в конъюгационном буфере (50 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10% глицерина) в течение 3,5 ч. при 25°C или в течение ночи при 4°C. реакцию останавливали посредством пропускания через колонку rProtein A GraviTrap (GE Healthcare). Колонку промывали 36 объемами колонки промывочного буфера (25 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 10% (об./об.) глицерина). Связанный конъюгат элюировали 5 объемами колонки элюирующего буфера (0,1 М глицин, pH 2,7, 50 мМ NaCl, 10% (об./об.) глицерина), при этом 0,5 объема колонки фракций собирали в пробирки, содержащие 1 М HEPES, pH 8, для нейтрализации кислоты. Белок-содержащие фракции объединяли и составляли в гистидиновом буфере (15 мМ гистидин, pH 6,5, 175 мМ сахараза, 0,02% Tween 20) с использованием обессоливающей колонки Zeba Spin (Thermo Fisher). Эндотоксины удаляли с использованием смолы для удаления эндотоксина Pierce High Capacity (Thermo Fisher) и стерильно фильтровали через фильтр 0,22 мкм. Конечную концентрацию ADC измеряли посредством спектроскопия в УФ и видимой области.

ADC IMAB362-МС-vc-PAВ-ММАЕ получали, как описано в WO2016/166122

(пример 1, раздел 3, стр. 75-76).

Аналитика ADC: DAR оценивали посредством обращенно-фазовой хроматографии на колонке PLRP-S, 300 Å, 2,1×150 мм, 3 мкм (Agilent), оперируемой при 0,7 мл/мин и 60°C с 9-минутным линейным градиентом (25-40%) с последующим 4-минутным линейным градиентом (40-75%) от 0,1% TFA/3% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O до 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN. Образцы сначала восстанавливали посредством инкубации с 10% об./об. 0,5 М DTT, pH 8,0, при 37°C в течение 15 минут. Все полученные ADC имели DAR LC=2 или DAR HC-LC=4.

Пример 8: Цитотоксические анализы *in vitro* ADC на основе антител против CLDN18.2 с использованием CLDN18.2-экспрессирующих клеток [данные из NBET'2483]

В примере 8 и следующем примере 9 ADC формулы [антитело]-HC-LC-PNU является ADC, в котором антитело конъюгировано по тяжелой и легкой цепи с токсином PNU-159682, и имеет DAR=4; ADC формулы [антитело]-HC-PNU или [антитело]-LC-PNU конъюгирован по тяжелой или легкой цепи, соответственно, с токсином PNU-159682 и имеет DAR=2. Все эти ADC также содержат олигопептидный линкер -LPQTGG- и этилендиаминовый нерасщепляемый линкер. Структуру ADC формулы [антитело]-LC-PNU можно видеть на фигуре 25.

Цитотоксичность ADC против CLDN18.2 исследовали с использованием клеток A549, или клеток HEK293T, или VxPC-3, сконструированных для гиперэкспрессии hCLDN18.2 (см. пример 3 и 4), или клеток PA-TU-8988S-high (см. пример 2), эндогенно экспрессирующих hCLDN18.2, и сравнивали с IMAB362-HC-G2-PNU, IMAB362-LC-G2-PNU, IMAB362-HC-LC-G2-PNU или IMAB362-MC-vc-PAV-MMAE. Клетки HEK293T и A549, сконструированные для гиперэкспрессии hCLDN18.1 (см. пример 3), использовали для демонстрации специфичности к CLDN18.2, но не к CLDN18.1.

В кратком изложении, 1000 клеток/лунку A549 или HEK293T, 5000 клеток/лунку VxPC-3 или 10000 клеток/лунку PA-TU-8988S-high высевали в белые 96-луночные планшеты с прозрачным дном (Greiner) (за исключением крайних лунок, содержащих воду) в 75 мкл DMEM с высокой глюкозой, 10% FCS, 100 МЕ/мл пенициллина/стрептомицина/фунгициона, 2 мМ L-глутамином и выращивали при 37°C во влажной камере в атмосфере 7,5% CO<sub>2</sub>. После одного дня инкубации каждый ADC добавляли в соответствующие лунки в количестве 25 мкл 4-кратного серийного разведения в полной среде для выращивания, получая концентрацию ADC от 5000 до 0,076 нг/мл в случае клеток A549, от 1000 до 0,015 нг/мл в случае клеток HEK293-T-, от 20000 до 0,25 нг/мл в случае клеток VxPC-3 и от 20000 до 0,31 нг/мл в случае клеток PA-TU-8988S. Еще через 4 дня планшеты вынимали из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры. Через приблизительно 30 мин в каждую лунку добавляли 50 мкл люминесцентного раствора CellTiter-Glo® 2.0 (Promega). После встряхивания планшетов при 450 об./мин. в течение 5 мин с последующей инкубацией в течение 10 мин без встряхивания люминесценцию измеряли с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Tecan Spark 10M с временем интегрирования 250 мсек на лунку. Кривые

люминесценции против концентрации ADC (нг/мл) аппроксимировали с помощью программного обеспечения Graphpad Prism (см. фигуры 11 до 19).

Анализы цитотоксичности *in vitro* показал, что сC11-1, сC11-2 и сC11-3, конъюгированные только с HC, только LC или HC и LC, демонстрировали лучшую цитотоксическую активность, чем сравнимым образом конъюгированное IMAB362 и IMAB362-MC-vc-PAВ-MMAE, в отношении клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (см. фигуру 11), клеток VxPC-3, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (см. фигуру 13), клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (см. фигуру 14), или клеток PA-TU-8988S-High (см. фигуру 16), в то время как цитотоксическую активность наблюдали только при очень высоких концентрациях ADC в клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.1 (см. фигуру 12), или клетках A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.1 (см. фигуру 15). Любую цитотоксическую активность в отношении клеток, гиперэкспрессирующих CLDN18.1, приписывали по меньшей мере в 1000 раз более высокой концентрации токсинов и наблюдали только при конъюгации DAR4 (токсины, конъюгированные с тяжелыми и легкими цепями антитела). Аналогично, контрольный ADC на основе антитела Ac10, не нацеленного на CLDN18.2, имел цитотоксическую активность только при очень высокой концентрации ADC (см. фигуру 14, 15).

Анализы цитотоксичности *in vitro* цитотоксичность также показали, что ADC на основе антител hC11a-hC11j с токсином, конъюгированным только с LC (что приводило к DAR 2), имели лучшую цитотоксическую активность в отношении клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (см. фигуру 17), клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (см. фигуру 18), или клеток PA-TU-8988S (см. фигуру 20), чем ADC на основе IMAB362 с токсином, аналогично конъюгированным с LC. Цитотоксическая активность ADC на основе антител hC11a-hC11j являлась селективной для клеток, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, они не имели цитотоксической активности в отношении клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.1 (см. фигуру 19).

Значения  $EC_{50}$  гуманизированных антител, конъюгированных по их LC, определенные с помощью внутренней функции определения  $EC_{50}$  "log(ингибитор) против ответа - переменный угловой коэффициент (четыре параметра)" программного обеспечения Prism, приведены в таблице 9.

Таблица 9: Значения  $EC_{50}$  (нг/мл) для тестируемых ADC на основе анализов цитотоксичности *in vitro*

ADC \ Линия клеток	A549-CLDN18.2		HEK293T- CLDN18.2	PATU8988S-high	
	hCL1a-LC-G2-PNU	4,8	4,4	2,4	56,5
hCL1b-LC-G2-PNU	6,4	4,4	2,1	64,3	96,8
hCL1c-LC-G2-PNU	30,0	30,6	6,1	727	1165
hCL1d-LC-G2-PNU	11,6	11,3	2,7	234	293

hCL1e-LC-G2-PNU	4,3	4,0	2,7	42,7	59,1
hCL1f-LC-G2-PNU	14,0	11,1	3,8	234,2	331,1
hCL1 г-LC-G2-PNU	70,7	57,3	6,9	1753	2213
hCL1h-LC-G2-PNU	3,3	2,9	1,8	37,9	37,2
hCL1i-LC-G2-PNU	3,8	2,4	1,8	35,1	34,8
hCL1j-LC-G2-PNU	5,3	4,0	1,6	64,2	91,8
IMAB362-LC-G2-PNU	70,25	61,41	15,23	3071	4264

В целом, все ADC по изобретению имеют высокий цитотоксический потенциал *in vitro* с более высокой цитотоксической активностью, чем IMAB362-LC-G2-PNU.

Пример 9: Анализ эффективности *in vivo* ADC hC11a-LC-G2-PNU и hC11f-LC-G2-PNU в моделях полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей

Следующие исследования осуществляли в Charles River GmbH (Freiburg, Germany).

Таблица 10: Модели полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей, используемые для оценки ADC hC11a-LC-G2-PNU и hC11f-LC-G2-PNU против CLDN18.2

Модель	Линия и пол мышей	Получение опухоли
GXA 3037 (аденокарцинома желудка)	Самки бестимусных мышей NMR1,	Имплантация опухоли унилатерально подкожно
CXF 742 (аденокарцинома толстого кишечника)	имплантация в возрасте 5-7 недель	Объем опухоли при рандомизации от 50 до 250 мм <sup>3</sup> (предпочтительно - 800200 мм <sup>3</sup> )
PAXF 2175 (протоковая карцинома поджелудочной железы)		
LIXFC 2050 (аденокарцинома легких)		

ADC против CLDN18.2 hC11a-LC-G2-PNU, hC11a(LALA)-LC-G2 и hC11f-LC-G2-PNU исследовали в моделях полученных из пациентов ксенотрансплантатов опухолей (PDX) по следующему протоколу исследования:

Таблица 11: Протоколы, используемые для оценки ADC против CLDN18.2 hC11a-LC-G2-PNU, hC11a(LALA)-LC-G2 и hC11f-LC-G2-PNU в моделях PDX.

Модель PDX	Группа	Кол-во мышей	Общая суточная доза	Дни введения	Путь
GXA 3037	Контрольный носитель	3	5 мл/кг физиологического раствора	1, 8, 15	Внутривенный

	hC11a-LC-G2-PNU	3	0,6 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a-LC-G2-PNU	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a(LALA)-LC-G2-PNU	3	0,2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11f-LC-G2-PNU	3	0,6 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11f-LC-G2-PNU	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	IMAB362-LC-G2-PNU	3	0,2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	IMAB362-LC-G2-PNU	3	0,6 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	IMAB362-LC-G2-PNU	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
CXF 742	Контрольный носитель	3	5 мл/кг физиологического раствора	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a-LC-G2-PNU	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	AC10-LC-G2-PNU (изотипический контроль)	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
PAXF 2175	Контрольный носитель	3	5 мл/кг физиологического раствора	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a-LC-G2-PNU	3	0,2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a-LC-G2-PNU	3	0,6 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a(LALA)-LC-G2-PNU	3	0,2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	IMAB362-LC-G2-PNU	3	0,2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
LIXFC 2050	Контрольный носитель	3	5 мл/кг физиологического раствора	1, 8, 15	Внутривенный
	hC11a-LC-G2-PNU	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный
	AC10-LC-G2-PNU (изотипический контроль)	3	2 мг/кг	1, 8, 15	Внутривенный

	контроль)				
--	-----------	--	--	--	--

Мышам подкожно унилатерально имплантировали материал PDX. Мышей распределяли по группам, когда опухоли достигали критериев рандомизации, и вводили им ADC, как указано в таблице 11, или носитель всего 3 раза. Объемы опухолей определяли посредством измерений калипером и регистрировали массу тела дважды в неделю. Мышей умерщвляли при достижении опухолевой массы 2000 мм<sup>3</sup> или значительной потере массы тела (более 30% всего или более 20% за два дня).

На фигурах 20-23 показано развитие относительного объема опухоли в течение исследований на разных моделях PDX. Ксенотрансплантаты опухоли, полученные с помощью полученного из пациентов опухолевого материала, имеющие экспрессию CLDN18.2, значимо отвечали на введение ADC по изобретению. Ответ (замедленный рост опухоли или уменьшение опухоли) при использовании ADC по изобретению при введении в более низких дозах (0,2 мг/кг или 0,6 мг/кг) был лучше, чем в случае схожих ADC на основе антитела против CLDN18.2 IMAB362, вводимых в тех же дозах, и сравнимо хорошим при введении в более высокой дозе 2 мг/кг.

### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий общую формулу A-(L-T)<sub>n</sub>, где

a. A является антителом или его фрагментом, связывающимся с CLDN18.2, содержащим последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно,

b. L является линкером, и

c. T является токсином,

где токсин является антрациклином,

где n является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 10$ ;

или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 1, где линкер L содержит по меньшей мере один нерасщепляемый линкерный элемент.

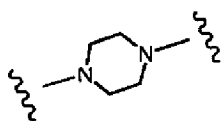
3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 2, где нерасщепляемый линкерный элемент выбран из группы, состоящей из

i. этилендиамина (EDA),

j. N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина,

k. диэтиламина (DEA),

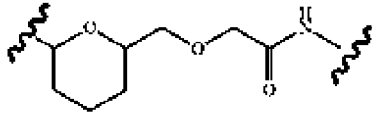
l. полученного из пиперазина соединения следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину и другому линкерному элементу,

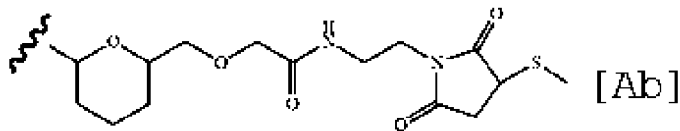


m. соединения следующей формулы:



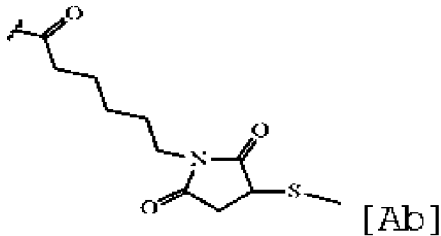
где волнистыми линиями указаны участки присоединения to токсин и another linker element,

n. соединение следующей формулы:



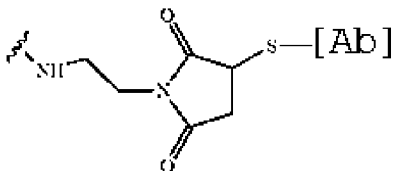
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

o. малеимидакапроилового соединения следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к другому линкерному элементу, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

p. соединения следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

и где нерасщепляемый линкерный элемент конъюгирован с токсином с помощью амидной связи или эфирной связи.

4. конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 2 или варианту осуществления 3, где линкер дополнительно содержит олигопептидный линкерный элемент, и/или ферментативно расщепляемый линкерный элемент, и/или спейсерный элемент.

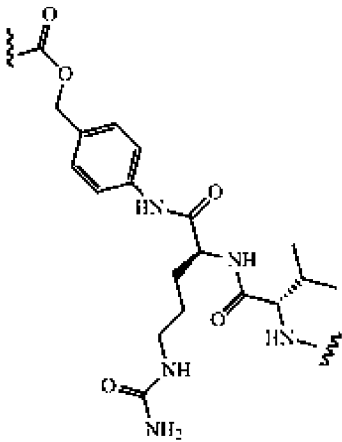
5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 4, где один олигопептидный линкерный элемент содержит олигопептидный мотив распознавания сортазой, выбранный из: -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXAG<sub>m</sub>-, -LPXSG<sub>m</sub>-, -LAXTG<sub>m</sub>-, -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXTA<sub>m</sub>-, -NPQTG<sub>m</sub>- или -NPQTN<sub>m</sub>-, при этом G<sub>m</sub> является олигоглицином, где m является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ , A<sub>m</sub> является олигоаланином, где m является

целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ ,  $N_m$  является олигоаспарагином, где  $m$  является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 21$ , и  $X$  является любой возможной аминокислотой, предпочтительно, олигопептидный мотив распознавания сортазой является -LPQTGG- или -LPETGG-.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 5, где олигопептидный линкерный элемент содержит:

- a. последовательность SEQ ID NO:131 или
- b. последовательность SEQ ID NO:132.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 4-6, где ферментативно расщепляемый линкерный элемент содержит линкер val-cit-PAB в соответствии с соединением следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к другим линкерным элементам.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 4-7, где спейсерный элемент содержит гибкий олигопептид, предпочтительно, где гибкий олигопептид состоит из G и S, более предпочтительно - где гибкий олигопептид является  $(GGGGS)_o$ , где  $o$  составляет 1, 2, 3, 4 или 5.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-8, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:

a. A-([олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [LPXTGG]-[этилендиамина] и

ii. [LPXTGG]-[];


b. A-([олигопептидный линкерный элемент-ферментативно расщепляемый линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина] и

ii. [LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина];

с. А-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-Т)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [GGGGS]-[LPXTGG]-[этилендиамина] и

ii. [GGGGS]-[LPXTGG]-[]; или

d. А-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-ферментативно расщепляемый линкерный элемент- нерасщепляемый линкерный элемент]-Т)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [GGGGS]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилендиамина] и

ii. [GGGGS]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина].

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 9, где нерасщепляемый линкерный элемент является этилендиамином, и где олигопептидный линкерный элемент является LPXTGG, где X является Q или E, предпочтительно, где X является Q.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-10, где

a. (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями антитела,

b. (L-T) ковалентно связан с обеими тяжелыми цепями антитела, или

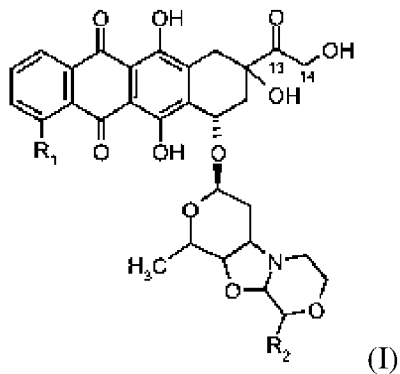
c. (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями и обеими тяжелыми цепями антитела.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-11, где (L-T)

a. связан с C-концом легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела, или

b. связан с боковой цепью аминокислоты легкой цепи антитела или тяжелой цепи антитела.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-12, где производное антрациклина имеет следующую формулу (I) и ковалентно связано с нерасщепляемым линкерным элементом с помощью C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы, или ковалентно связано с нерасщепляемым линкерным элементом с помощью гидроксильной группы на C<sub>14</sub>:



и где R<sub>1</sub> является атомом водорода, гидроксигруппой или метоксигруппой,

и где R<sub>2</sub> является C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-алкоксигруппой.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-13, где производное антрациклина является производным 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682).

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-14, где А, антитело или его фрагмент, содержит:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

б. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

в. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно;

г. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

д. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

е. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

ж. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

з. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно; или

и. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-14, где А, антитело или его фрагмент, содержит:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

б. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID

NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно; или

с. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-15, где А, антитело или его фрагмент, содержит:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:33 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- c. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:39;
- d. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- e. последовательность VH SEQ ID NO:35 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- f. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- g. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- h. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- i. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

или

- j. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:39.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-14 или 16, где А, антитело или его фрагмент, содержит:

- a. последовательность VH SEQ ID NO:27 и последовательность VL SEQ ID NO:28;
- b. последовательность VH SEQ ID NO:29 и последовательность VL SEQ ID NO:30;

или

- c. последовательность VH SEQ ID NO:31 и последовательность VL SEQ ID NO:32.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-15 или 17, где А, антитело или его фрагмент, содержит:

a. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

b. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

c. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52;

d. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;

e. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;

f. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54;

g. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;

h. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой

цепи SEQ ID NO:54;

i. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51; или

j. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

20. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-19, где способ включает следующие стадии:

g. получение А, антитела или его фрагмента с олигопептидным линкерным элементом, предпочтительно, на С-конце, необязательно, с предшествующим спейсерным элементом на легких и/или тяжелых цепях антитела,

h. получение одного или более токсинов Т с нерасщепляемым линкерным элементом, и

i. конъюгация антитела и токсина, приводящая к получению конъюгата антитело-лекарственное средство.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:46 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамин] на С-конце легких цепей, и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:133, и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамина] на С-конце легких цепей, и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:134 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQXTGG]-[этилендиамина] на С-конце легких цепей, и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицин (PNU-159682), ковалентно

связанного с этилендиамином линкера в С<sub>13</sub>, что приводит к утрате С<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-23 и эксципиент.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-23 для применения в лечении.

26. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 1-23 для применения в лечении злокачественного новообразования.

27. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 24, где злокачественное новообразование выбрано из рака поджелудочной железы, желудка, пищевода, яичников и легких.'

#### **Последовательности**

SEQ ID NO:1 DYAMH

SEQ ID NO:2 WINTYTGKPTYADDFKG

SEQ ID NO:3 AVFYGYTMDA

SEQ ID NO:4 RASEDIYSNLA

SEQ ID NO:5 SVKRLQD

SEQ ID NO:6 LQGSNFPLT

SEQ ID NO:7 WINAYTGKPTYADDFKG

SEQ ID NO:8 AVYYGYTMDA

SEQ ID NO:9 RTSEDIYSNFA

SEQ ID NO:10 SVNRLQD

SEQ ID NO:11 LQGSKFPLT

SEQ ID NO:12 DYAMY

SEQ ID NO:13 RTSEDIYSNLA

SEQ ID NO:14 AIKRLQD

SEQ ID NO:15 WINTYTGKPTYAQKFQG

SEQ ID NO:16 WINTYTGKPTYSQKFQG

SEQ ID NO:17 RTSEDIYSNLA

SEQ ID NO:18 RTSEDIYSNFA

SEQ ID NO:19 SVNRLQD

SEQ ID NO:20 WINAYTGKPTYAQKFQG

SEQ ID NO:21 DYAMX

X в 5-ом положении является H или Y

SEQ ID NO:22 WINXYTGKPTYXXXFXG

X в 4-ом положении является T или A;

X в 12-ом положении является A или S;

X в 13-ом положении является D или Q;

X в 14-ом положении является D или K;

X в 16-ом положении является K или Q

SEQ ID NO:23 AVXYGYTMDA

X в 3-ем положении является F или Y

SEQ ID NO:24 RXSEDIYSNXA

X во 2-ом положении является A или T;

X в 10-ом положении является L или F

SEQ ID NO:25 XXXRLQD

X в 1-ом положении является S или A;

X во 2-ом положении является V или I;

X в 3-ем положении является K или N

SEQ ID NO:26 LQGSXFPLT

X в 5-ом положении является K или N

SEQ ID NO:27, переменная область HC cC11-1

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMHWVKQAPGKGLKWMGWINT  
YTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQ  
GTSVTVSS

SEQ ID NO:28, переменная область LC cC11-1

DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFSVKRLQD  
GVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:29, переменная область HC cC11-2

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFTDYAMHWVKQGPVKGMKWMGWIN  
AYTGKPTYADDFKGRFVLSLEASASTANLQISNLKNEEDTATYFCARAVYYYGYTMDAW  
GQGTSVIVSS

SEQ ID NO:30, переменная область LC cC11-2

DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQQKSGKSPQLLIYSVNRLQDG  
VPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:31, переменная область HC cC11-3

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMYWVKQVPGKGLRWMGWINT  
YTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQ  
GTSVTVSS

SEQ ID NO:32, переменная область LC cC11-3

DIQMTQSPASLSASLGETISIACRTSEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFAIKRLQDG  
VPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO:33, переменная область HC hCL1a

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
WGQGLVTVSS

SEQ ID NO:34, переменная область HC hCL1b, c и d

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDAW  
GQGLVTVSS



SEQ ID NO:35, переменная область HC hCL1e

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:36, переменная область HC hCL1f и g

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:37, переменная область HC hCL1h, i и j

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVYYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:38, переменная область LC hCL1a, b, e и i

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWEYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQ  
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:39, переменная область LC hCL1c и j

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWEYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQD  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:40, переменная область LC hCL1d и g

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWEYQQKPGKAPKLLIYSVNRLLQ  
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:41, переменная область LC hCL1f и h

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWEYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQ  
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:42, переменная область HC hCL3a, b и c

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSVSSNYRWHWIRQPPGKGLEWIGYINIA  
 GSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARNPSITRAMDAWGQGT  
 LTVTVSS

SEQ ID NO:43, переменная область LC hCL3a

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQNIFKNLEWEYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ  
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:44, переменная область LC hCL3b

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWEYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ  
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:45, переменная область LC hCL3c

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWEYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ  
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:46, полноразмерная HC hCL1a

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA

WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K  
 или R

SEQ ID NO:47, полноразмерная HC hCL1b, c и d

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDAW  
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC  
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K или R

SEQ ID NO:48, полноразмерная HC hCL1e

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K  
 или R

SEQ ID NO:49, полноразмерная HC hCL1f и g

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K  
 или R

SEQ ID NO:50, полноразмерная HC hCL1h, i и j

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVYYGYTMDA  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является К  
 или R

SEQ ID NO:51, полноразмерная LC hCL1a, b, e и i

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQ  
 DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF  
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:52, полноразмерная LC hCL1c и j

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQD  
 GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS  
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:53, полноразмерная LC hCL1d и g

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQQKPGKAPKLLIYSVNRLQ  
 DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF  
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:54, полноразмерная LC hCL1f и h

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQ  
 DGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF  
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:55, полноразмерная HC IMAB362

QVQLQPGAEVLRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKRPGGLEWIGNIYPS  
 DSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGGQ  
 TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является К или R

SEQ ID NO:56, полноразмерная LC IMAB362

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLI  
 YWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIKR  
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
 SKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:57 DQWSTQDLYN

SEQ ID NO:58 NNPVTA VFNYQ

SEQ ID NO:59 STQDLYNNPVTA VF

SEQ ID NO:60 TNFWMSTANMYTG

SEQ ID NO:61 ALMIVGIVLGAIGLLV

SEQ ID NO:62 RIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVS

SEQ ID NO:63

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAPARRARRTKLGTGTELGSTPVWWNSADGRM  
DQWSTQDLYNNPVTA VFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQH  
SGGRSRRARTKTHLRRGSE

SEQ ID NO:64 MDQWSTQDLYNNPVT

SEQ ID NO:65 LYNNPVTA VFNYQGL

SEQ ID NO:66 VFNYQGLWRSCVRES

SEQ ID NO:67 QGLWRSCVRESSGFT

SEQ ID NO:68 RSCVRESSGFTECRG

SEQ ID NO:69 TEDEVQSYPSKHDYV

SEQ ID NO:70 EVQSYPSKHDYV

SEQ ID NO:71 gactacgcgatgcac

SEQ ID NO:72

tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO:73 gccgtctctacggatatac gatggacgcg

SEQ ID NO:74

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtcaagggcagcggata  
tacgttcacggactacgcgatgcactgggtcaagcaagcgggggaaagggctgaagtggatggggtgatcaacacgtacacggg  
aagccgacatacgcggacgactcaagggcgaltcgtgtctcgtggaggcgcgagcagcggcgaacctgcaaatctcgaacct  
gaagaacgaggacacggcgacttctgcgcgggcccgtctctacggatatac gatggacgcgtgggggaggggtaccagcgtg  
acggctcgcgac

SEQ ID NO:75 cgggcgagcagggacatctactgaacctggcg

SEQ ID NO:76 tccgtcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO:77 ctgcaagggagcaactcccgtgacg

SEQ ID NO:78

gacatccagatgacgcagagccccggcgtcgtgagcgcgagcctgggggagacgatctc gatcgcgtgccgggagcgcga  
ggacatctactcgaacctggcgtggtatcaacagaagagcgggaagagccccgagctgctgatcttctccgtcaagcggctgcaagacg  
gcgtcccagcccattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact  
acttctgctgcaagggagcaactcccgtgacgttcgggtcgggtaccaactcagatcaaa

SEQ ID NO:79

tggatcaacgcgtacacggggaagccgacactacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO:80 gccgtctactacggatatac gatggac

SEQ ID NO:81

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtcaagacgagcggata

tacgttcacggactacgcgatgactgggtcaagcaggggccagggaaagggatgaagtggatggggtggatcaacgcgtacacgggg  
 aagccgacctacgcggacgacttcaagggcgattcgtgctgagcctggaggcgagcgcctcgacggcgaacctgcaaatctgaaacct  
 gaagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggccgtctactacggatatacgatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtg  
 atcgtctcgagc

SEQ ID NO:82 cggacgagcgaggacatctactgaacttcgcg

SEQ ID NO:83 tcagtcaaccggctgcaagac

SEQ ID NO:84 ctgcaaggagcaagttcccgtgacg

SEQ ID NO:85

gacatccagatgacgcagagccccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgatcgagtccggacgagcga  
 ggacatctactgaacttcgctggttccagcagaagagcgggaagagccccgagctgctgatctactcagtcaaccggctgcaagacgg  
 cgtcccagccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggacta  
 cttctgctgcaaggagcaagttcccgtgacgttcgggagcgggtaccaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO:86 gactacgcgatgtac

SEQ ID NO:87

tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg

SEQ ID NO:88

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtgcaaggcgagcggata  
 tacgttcacggactacgcgatgactgggtcaagcaagtcccggggaagggtgcgatggatggggtggatcaacacgtacacgggga  
 agccgacctacgcggacgacttcaagggggcattcgtgttctcgtggaggcgagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctgaaacctg  
 aagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggccgttctacggatatacgatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtga  
 cggctctcgagc

SEQ ID NO:89 cggacgagcgaggacatctactgaacctggcg

SEQ ID NO:90 gcgatcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO:91

gacatccagatgacgcagagccccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgatcgcgtccggacgagcga  
 ggacatctactgaacctggcgtggtatcaacagaagagcgggaagagccccgagctgctgatcttcgatcaagcggctgcaagacg  
 gcgtcccagccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact  
 acttctgctgcaaggagcaagttcccgtgacgttcgggtcgggtaccaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO:92

tggatcaatacatacacggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga

SEQ ID NO:93 gcggtctctacggatatacgatggatgcc

SEQ ID NO:94

caggccaactagtccaagcggggcggaagtcaagaagccccggagcatccgtcaaagtcagctgcaaggcgagcggatata  
 acatttacggactacgcgatgactgggtcaggcaagcccctgggcaaaaggctcgaatggatgggatggatcaatacatacacggggaa  
 gccgacttatgcgcaaaaattccaaggaagagtcacaattacggggatacatccgcatctaccgectacatggagctaaagctcgtcggg  
 agcggagatacggcggctactattgcgcccagcgggtctctacggatatacgatggatgcctgggggcagggtaccctggtcacggct  
 cgagc

SEQ ID NO:95 agggcctccgaagacatctactccaacctggca

SEQ ID NO:96 agcgtcaaaagactacaagat

SEQ ID NO:97 ttgcaaggaagcaattcccctgact

SEQ ID NO:98

gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgctgagcgcacggtcggggatagagtcaccataacatgcaggcctccgaaga  
catctactccaacctggcatggtatcaacaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagta  
ccgagccgattttcgggaagcgggagcgggacggatttcacgctgaccatatcaagtttgaaccggaggattttgcacatactattgctt  
gcaaggaagcaatttccccttgactttcgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO:99 gattatgcaatgcac

SEQ ID NO:100

tggattaacacctacacgggcaagcccacatactccccaaaaattccaagga

SEQ ID NO:101 gctgtattctatggatatacaatggatgcc

SEQ ID NO:102

caggccaattagtcxaaagcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtcaaagtctcatgcaaagcgagcggatac  
acatttacggattatgcaatgcaactgggtcaggcaagcaccggacaaaggctggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaag  
cccacatactccccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatgggatggattaacacct  
acacgggcaagcccacatactccccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgcgagcaccgtaccctggtcacc  
gtctcgagc

SEQ ID NO:103 cgaacgagcgaggacatactcaaaccttgca

SEQ ID NO:104 gcgataaagaggctgcaagac

SEQ ID NO:105 ttgcaaggctccaaatttcccctgaca

SEQ ID NO:106

gacatccaaatgactcaaagcccatcatcgctatcggcatcggtcggggatagagtcacgataacatgccgaacgagcggagga  
catatactcaaaccttgcatggtatcaacaaaaccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaagaggctgcaagacggagtt  
ccatcacgattttcgggatctggctcggggaccgattttacgctgactatcatcgctgcaaccggaagattttgcaacatactactgcttga  
aggctccaaatttcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO:107 cggacgagcaggatatttattcgaactttgca

SEQ ID NO:108 cagtcaatcggtacaagat

SEQ ID NO:109

gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgctgagcgcacgtcggggaccgtgcacaatcacatgccggacgagcggag  
atatttattcgaactttgcatggtatcaacaaaaccgggcaaggctccgaaacttttgattattcagtcaatcggtacaagatggcgtccc  
agccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacgctgacgatcatcgctacaaccggaggacttcgcgacttattactgctaca  
agggagcaaatcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO:110 gattacgcaatgtac

SEQ ID NO:111

tggataaatacctatacgggaaagccaacatacgccecaaaaattccaaggc

SEQ ID NO:112 gccgtctttatggatatac gatggacgca

SEQ ID NO:113

caggccaactggtccaatcgggggctgaagtcaaaaagccggggcgagcgtcaaagtcagctgcaaagcatcgggatac  
acatttacggattacgcaatgtactgggtcaggcaagcaccggccaacgactggaatggatgggctggataaatacctatacgggaaag  
ccaacatacgccecaaaaattccaagcccgctcacaataacgcccacacgagcgcacatcgacggcttatatggaactatcatcgctcga  
tcggaagacacggcggctattattgcgcacgcgccgtctttatggatatac gatggacgatggggcgagggtaccctggtcaggtctc  
gagc

SEQ ID NO:114 gactacgcaatgcac

SEQ ID NO:115

tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga

SEQ ID NO:116 gccgtcttctatggatatac gatggatgct

SEQ ID NO:117

cagggtccaattgggtccaagcggggcgagggtcaagaagccggggcgagcgtcaaagtctcatgcaaggcaagcgggat  
acatttacggactacgcaatgactgggtccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacacggggaag  
ccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgattacgcgggatactagcgcgagcaccgcatatatggagctaagctcgtcga  
tctgaggataccgctgtatactactgcgcgagagccgtcttctatggatatac gatggatgcttggggcgagggtaccctggtcacggctc  
agc

SEQ ID NO:118 cgagcttcggaggacatctatagcaactggct

SEQ ID NO:119 agcgtcaaaaggctccaagac

SEQ ID NO:120 ctacaaggctctaactcccattgaca

SEQ ID NO:121

gatatccaatgacgcaatccatctagcctatcgccctctgtggggaccgagtcaccatcacatgccgagcttcggaggac  
atctatagcaactggcttggatcaacaaaagccgggaaagcaccaaagctgctgatatatagcgtcaaaaggctccaagacggagtc  
caagecgattctcgggtccggctccgggacggatttacgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactattgctac  
aaggctctaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO:122 gactacgctatgtat

SEQ ID NO:123

tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga

SEQ ID NO:124 gcggtctactatggatatac gatggacgca

SEQ ID NO:125

cagggtccaactggttcaatctggagcgggaagtcaagaagcccggagcatccgtcaaagtctcgtgcaaggcatctggatacac  
attcaccgactacgctatgtattgggtccggcaagccccggacaacggctggaatggatgggatggattaatgectacaccgggaagcc  
gacttatgcgcaaaaattccaaggaagggtcacgattacgcgggacacgagcgcctcaaccgatacatggagctatcgagcctcgaag  
cgaggacaccgcggtctactactgcgcgggcggtctactatggatatac gatggacgcatggggcgagggtaccctggtcacggctc  
gagc

SEQ ID NO:126 WINXYTGKPTYXQKFQG

X в 4-ом положении является T или A;

X в 12-ом положении является A или S

[CDR2 HC только для hC11x, а не химерных клонов cC11-1,2,3]

SEQ ID NO:127

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[константный домен легкой цепи - CL]

SEQ ID NO:128

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK  
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K или R  
 [константный домен тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO:129

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEFPA  
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K или R  
 [мутация L234A/L235A в константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO:130

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEFPA  
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K или R  
 [мутация L236A/L236A/P329G в константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO:131 LPQTGG [метка сортазы]

SEQ ID NO:132 GGGGS-LPQTGG [метка сортазы]

SEQ ID NO:133 полноразмерная HC hCL1a LALA

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD  
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K  
 или R

SEQ ID NO:134 полноразмерная hCL1a HC LALAPG

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI  
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA  
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD



DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX, X является K или R

SEQ ID NO:135 CLDN18.2

MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSC  
VRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAK  
ANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTF  
GAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKAS  
TGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV

SEQ ID NO:136 LPXTG<sub>m</sub> [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот, m=1-21.

SEQ ID NO:137 LPXAG<sub>m</sub> [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот, m=1-21.

SEQ ID NO:138 LPXSG<sub>m</sub> [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот, m=1-21.

SEQ ID NO:139 LAXTG<sub>m</sub> [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот, m=1-21.

SEQ ID NO:140 LPXTA<sub>m</sub> [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот, m=1-21.

SEQ ID NO:141 NPQTG<sub>m</sub> [метка сортазы]

SEQ ID NO:142 NPQTN<sub>m</sub> [метка сортазы]

SEQ ID NO:143 LPETGG [метка сортазы]

SEQ ID NO:144 (GGGGS)<sub>o</sub> [олигопептид], o=1-5

SEQ ID NO:145 LPXTGG [метка сортазы]

X в 3-м положении является любой из 20 природных аминокислот.

SEQ ID NO:146 GGGSLPXTGG [метка сортазы]

X в 8-ом положении является любой из 20 природных аминокислот.

SEQ ID NO:147 GGGGG [олигопептид]

SEQ ID NO:148 LPQTG [метка сортазы]

#### **Ссылки**

Abbott, W. M., M. M. Damschroder, and D. C. Lowe. 2014. 'Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions', *Immunology*, 142: 526-35.

Abdiche, Y. N., D. S. Malashock, A. Pinkerton, and J. Pons. 2009. 'Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors', *Anal Biochem*, 386: 172-80.

Aguiar, S., J. Dias, A. M. Manuel, R. Russo, P. M. P. Gois, F. A. da Silva, and J. Goncalves. 2018. 'Chimeric Small Antibody Fragments as Strategy to Deliver Therapeutic Payloads', *Adv Protein Chem Struct Biol*, 112: 143-82.

Alegre, M. L., A. M. Collins, V. L. Pulito, R. A. Brosius, W. C. Olson, R. A. Zivin, R. Knowles, J. R. Thistlethwaite, L. K. Jolliffe, and J. A. Bluestone. 1992. 'Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody', *J Immunol*, 148: 3461-8.

An, Z., G. Forrest, R. Moore, M. Cukan, P. Haytko, L. Huang, S. Vitelli, J. Z. Zhao, P. Lu, J. Hua, C. R. Gibson, B. R. Harvey, D. Montgomery, D. Zaller, F. Wang, and W. Strohl. 2009. 'IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function', *MAbs*, 1: 572-9.

Bolt, S., E. Routledge, I. Lloyd, L. Chatenoud, H. Pope, S. D. Gorman, M. Clark, and H. Waldmann. 1993. 'The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties', *Eur J Immunol*, 23: 403-11.

Broggini, M. 2008. 'Nemorubicin', *Top Curr Chem*, 283: 191-206.

Chang, Z. L., and Y. Y. Chen. 2017. 'CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond', *Trends Mol Med*, 23: 430-50.

Chen, X., J. L. Zaro, and W. C. Shen. 2013. 'Fusion protein linkers: property, design and functionality', *Adv Drug Deliv Rev*, 65: 1357-69.

Chu, S. Y., I. Vostiar, S. Karki, G. L. Moore, G. A. Lazar, E. Pong, P. F. Joyce, D. E. Szymkowski, and J. R. Desjarlais. 2008. 'Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies', *Mol Immunol*, 45: 3926-33.

"Crosslinking Technical Handbook." In. 2012. *easy molecular bonding - crosslinking technology*, edited by Thermo Scientific, 56. USA: Thermo Scientific.

Dall'Acqua, W. F., R. M. Woods, E. S. Ward, S. R. Palaszynski, N. K. Patel, Y. A. Brewah, H. Wu, P. A. Kiener, and S. Langermann. 2002. 'Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences', *J Immunol*, 169: 5171-80.

Diebold, C. A., F. J. Beurskens, R. N. de Jong, R. I. Koning, K. Strumane, M. A. Lindorfer, M. Voorhorst, D. Ugurlar, S. Rosati, A. J. Heck, J. G. van de Winkel, I. A. Wilson, A. J. Koster, R. P. Taylor, E. O. Saphire, D. R. Burton, J. Schuurman, P. Gros, and P. W. Parren. 2014. 'Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface', *Science*, 343: 1260-3.

Du, Y., A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, and H. Liu. 2012. 'Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies', *MAbs*, 4: 578-85.

Ellerman, D. 2019. 'Bispecific T-cell engagers: Towards understanding variables influencing the in vitro potency and tumor selectivity and their modulation to enhance their efficacy and safety', *Methods*, 154: 102-17.

Gervais, D. 2016. 'Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact', *J Chem Technol Biotechnol*, 91: 569-75.

Green, M. R. , and J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Hansel, T. T., H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell, and A. J. George. 2010. 'The safety and side effects of monoclonal antibodies', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 325-38.

Hashimoto, Y., W. Zhou, K. Hamauchi, K. Shirakura, T. Doi, K. Yagi, T. Sawasaki, Y. Okada, M. Kondoh, and H. Takeda. 2018. 'Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5', *Sci Rep*, 8: 8383.

Hewitt, K. J., R. Agarwal, and P. J. Morin. 2006. 'The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues', *BMC Cancer*, 6: 186.

Holte, D., J. P. Lyssikatos, A. M. Valdiosera, Z. Swinney, V. Sisodiya, J. Sandoval, C. Lee, M. A. Aujay, R. B. Tchelepi, O. M. Hamdy, C. Gu, B. Lin, H. Sarvaiya, M. A. Pysz, A. Laysang, S. Williams, D. Jun Lee, M. K. Holda, J. W. Purcell, and J. Gavriluk. 2020. 'Evaluation of PNU-159682 antibody drug conjugates (ADCs)', *Bioorg Med Chem Lett*, 30: 127640.

Idusogie, E. E., P. Y. Wong, L. G. Presta, H. Gazzano-Santoro, K. Totpal, M. Ultsch, and M. G. Mulkerrin. 2001. 'Engineered antibodies with increased activity to recruit complement', *J Immunol*, 166: 2571-5.

Jacobi, A., B. Enenkel, P. Garidel, C. Eckermann, M. Knappenberger, I. Presser, and H. Kaufmann. 2014. 'Process Development and Manufacturing of Therapeutic Antibodies.' in S. Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Jain, N., S. W. Smith, S. Ghone, and B. Tomczuk. 2015. 'Current ADC Linker Chemistry', *Pharm Res*, 32: 3526-40.

Jiang, H., Z. Shi, P. Wang, C. Wang, L. Yang, G. Du, H. Zhang, B. Shi, J. Jia, Q. Li, H. Wang, and Z. Li. 2018. 'Claudin18.2-Specific Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Gastric Cancer', *J Natl Cancer Inst*.

June, C. H., and M. Sadelain. 2018. 'Chimeric Antigen Receptor Therapy', *N Engl J Med*, 379: 64-73.

Klose, D., M. Woitok, J. Niesen, R. R. Beerli, U. Grawunder, R. Fischer, S. Barth, R. Fendel, and T. Nachreiner. 2017. 'Generation of an artificial human B cell line test system using Transpo-mAbTM technology to evaluate the therapeutic efficacy of novel antigen-specific fusion proteins', *PLoS One*, 12: e0180305.

Lazar, G. A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J. S. Peng, L. Hyun, C. Chan, H. S. Chung, A. Eivazi, S. C. Yoder, J. Vielmetter, D. F. Carmichael, R. J. Hayes, and B. I. Dahiya. 2006. 'Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 4005-10.

Leabman, M. K., Y. G. Meng, R. F. Kelley, L. E. DeForge, K. J. Cowan, and S. Iyer. 2013. 'Effects of altered Fc $\gamma$ R binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys', *MAbs*, 5: 896-903.

Lo, M., H. S. Kim, R. K. Tong, T. W. Bainbridge, J. M. Vernes, Y. Zhang, Y. L. Lin, S. Chung, M. S. Dennis, Y. J. Zuchero, R. J. Watts, J. A. Couch, Y. G. Meng, J. K. Atwal, R. J. Brezski, C. Spiess, and J. A. Ernst. 2017. 'Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice', *J Biol Chem*, 292: 3900-08.

Lu, X., R. P. Nobrega, H. Lynaugh, T. Jain, K. Barlow, T. Boland, A. Sivasubramanian, M. Vasquez, and Y. Xu. 2019. 'Deamidation and isomerization liability analysis of 131 clinical-stage antibodies', *MAbs*, 11: 45-57.

Martin, A. C. R., and J. Allemn. 2014. 'Bioinformatics Tools for Analysis of Antibodies.'

in, *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Mimoto, F., T. Igawa, T. Kuramochi, H. Katada, S. Kadono, T. Kamikawa, M. Shida-Kawazoe, and K. Hattori. 2013. 'Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior Fcγ<sub>2</sub>R binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant', *MAbs*, 5: 229-36.

Moldenhauer, G. 2014. 'Selection Strategies for Monoclonal Antibodies.' in S. Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Moore, G. L., H. Chen, S. Karki, and G. A. Lazar. 2010. 'Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions', *MAbs*, 2: 181-9.

Natsume, A., M. In, H. Takamura, T. Nakagawa, Y. Shimizu, K. Kitajima, M. Wakitani, S. Ohta, M. Satoh, K. Shitara, and R. Niwa. 2008. 'Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities', *Cancer Res*, 68: 3863-72.

Niimi, T., K. Nagashima, J. M. Ward, P. Minoo, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, and S. Kimura. 2001. 'Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing', *Mol Cell Biol*, 21: 7380-90.

Nuijens, T., A. Toplak, M. Schmidt, A. Ricci, and W. Cabri. 2019. 'Natural Occurring and Engineered Enzymes for Peptide Ligation and Cyclization', *Front Chem*, 7: 829.

Ponziani, S., G. Di Vittorio, G. Pitari, A. M. Cimini, M. Ardini, R. Gentile, S. Iacobelli, G. Sala, E. Capone, D. J. Flavell, R. Ippoliti, and F. Giansanti. 2020. 'Antibody-Drug Conjugates: The New Frontier of Chemotherapy', *Int J Mol Sci*, 21.

Quintieri, L., C. Geroni, M. Fantin, R. Battaglia, A. Rosato, W. Speed, P. Zanovello, and M. Floreani. 2005. 'Formation and antitumor activity of PNU-159682, a major metabolite of nemorubicin in human liver microsomes', *Clin Cancer Res*, 11: 1608-17.

Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. 'Optimization of antibody binding to Fcγ<sub>2</sub>RIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells', *Mol Cancer Ther*, 7: 2517-27.

Rother, R. P., S. A. Rollins, C. F. Mojcik, R. A. Brodsky, and L. Bell. 2007. 'Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria', *Nat Biotechnol*, 25: 1256-64.

Sahin, U., M. Koslowski, K. Dhaene, D. Usener, G. Brandenburg, G. Seitz, C. Huber, and O. Tureci. 2008. 'Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development', *Clin Cancer Res*, 14: 7624-34.

Sahin, U., M. Schuler, H. Richly, S. Bauer, A. Krilova, T. Dechow, M. Jerling, M. Utsch, C. Rohde, K. Dhaene, C. Huber, and O. Tureci. 2018. 'A phase I dose-escalation study of IMAB362 (Zolbetuximab) in patients with advanced gastric and gastro-oesophageal junction cancer', *Eur J Cancer*, 100: 17-26.

Saldanha, J. W. 2014. 'Humanization Strategies.' in S. Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Shang, L., B. Daubeuf, M. Triantafilou, R. Olden, F. Depis, A. C. Raby, S. Herren, A. Dos Santos, P. Malinge, I. Dunn-Siegrist, S. Benmkaddem, A. Geinoz, G. Magistrelli, F. Rousseau, V. Buatois, S. Salgado-Pires, W. Reith, R. Monteiro, J. Pugin, O. Leger, W. Ferlin, M. Kosco-Vilbois, K. Triantafilou, and G. Elson. 2014. 'Selective antibody intervention of Toll-like receptor 4 activation through Fc gamma receptor tethering', *J Biol Chem*, 289: 15309-18.

Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox, and L. G. Presta. 2001. 'High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R', *J Biol Chem*, 276: 6591-604.

Stavenhagen, J. B., S. Gorlatov, N. Tuailon, C. T. Rankin, H. Li, S. Burke, L. Huang, S. Vijh, S. Johnson, E. Bonvini, and S. Koenig. 2007. 'Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fc gamma receptors', *Cancer Res*, 67: 8882-90.

Stefan, N., R. Gebleux, L. Waldmeier, T. Hell, M. Escher, F. I. Wolter, U. Grawunder, and R. R. Beerli. 2017. 'Highly Potent, Anthracycline-based Antibody-Drug Conjugates Generated by Enzymatic, Site-specific Conjugation', *Mol Cancer Ther*, 16: 879-92.

Tao, M. H., and S. L. Morrison. 1989. 'Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region', *J Immunol*, 143: 2595-601.

Tureci, O., U. Sahin, H. Schulze-Bergkamen, Z. Zvirbule, F. Lordick, D. Koeberle, P. Thuss-Patience, T. Ettrich, D. Arnold, F. Bassermann, S. E. Al-Batran, K. Wiechen, K. Dhaene, D. Maurus, M. Gold, C. Huber, A. Krivoschik, A. Arozullah, J. W. Park, and M. Schuler. 2019. 'A multicentre, phase 2a study of zolbetuximab as a single agent in patients with recurrent or refractory advanced adenocarcinoma of the stomach or lower oesophagus: the MONO study', *Ann Oncol*.

Vafa, O., G. L. Gilliland, R. J. Brezski, B. Strake, T. Wilkinson, E. R. Lacy, B. Scallon, A. Teplyakov, T. J. Malia, and W. R. Strohl. 2014. 'An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations', *Methods*, 65: 114-26.

Waldmeier, L., I. Hellmann, C. K. Gutknecht, F. I. Wolter, S. C. Cook, S. T. Reddy, U. Grawunder, and R. R. Beerli. 2016. 'Transpo-mAb display: Transposition-mediated B cell display and functional screening of full-length IgG antibody libraries', *MAbs*, 8: 726-40.

Walker, M. R., J. Lund, K. M. Thompson, and R. Jefferis. 1989. 'Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors', *Biochem J*, 259: 347-53.

Wang, X., M. Mathieu, and R. J. Brezski. 2018. 'IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions', *Protein Cell*, 9: 63-73.

Xu, D., M. L. Alegre, S. S. Varga, A. L. Rothermel, A. M. Collins, V. L. Pulito, L. S.

Hanna, K. P. Dolan, P. W. Parren, J. A. Bluestone, L. K. Jolliffe, and R. A. Zivin. 2000. 'In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies', *Cell Immunol*, 200: 16-26.

Yu, D., and J. R. Turner. 2008. 'Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 709-16.

Yu, S. F., B. Zheng, M. Go, J. Lau, S. Spencer, H. Raab, R. Soriano, S. Jhunjhunwala, R. Cohen, M. Caruso, P. Polakis, J. Flygare, and A. G. Polson. 2015. 'A Novel Anti-CD22 Anthracycline-Based Antibody-Drug Conjugate (ADC) That Overcomes Resistance to Auristatin-Based ADCs', *Clin Cancer Res*, 21: 3298-306.

Zalevsky, J., A. K. Chamberlain, H. M. Horton, S. Karki, I. W. Leung, T. J. Sproule, G. A. Lazar, D. C. Roopenian, and J. R. Desjarlais. 2010. 'Enhanced antibody half-life improves in vivo activity', *Nat Biotechnol*, 28: 157-9.

CN109762067

Патент США № 10435471

WO2000/015659

WO2004/047863

WO2005/113587

WO2007/059997

WO2008/145338

WO2010/009124

WO2013/167259

WO2013/174509

WO2014/075788

WO2014/127906

WO2016/102679

WO2016/166122

WO2016/165762

WO2018/006882

WO2019/173420

WO2019/175617

WO2019/219089

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий общую формулу A-(L-T)<sub>n</sub>, где

a. A является антителом или его фрагментом, связывающимся с CLDN18.2, содержащим последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26, соответственно,

b. L является линкером, и

c. T является токсином,

где токсин является антрациклином,

где n является целым числом от  $\geq 1$  до  $\leq 10$ ;

или его фармацевтически приемлемая соль или сложный эфир.

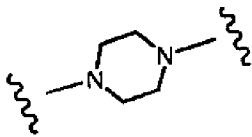
2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где линкер L содержит по меньшей мере один нерасщепляемый линкерный элемент, предпочтительно, где нерасщепляемый линкерный элемент выбран из группы, состоящей из

a. этилендиамина (EDA),

b. N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина,

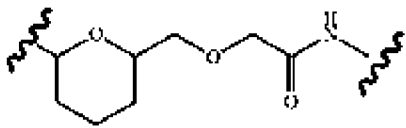
c. диэтиламина (DEA),

d. полученного из пиперазина соединения следующей формулы:



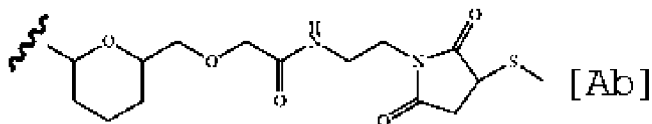
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину и другому линкерному элементу,

e. соединения следующей формулы:



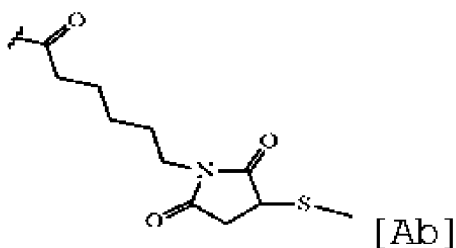
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину и другому линкерному элементу,

f. соединения следующей формулы:



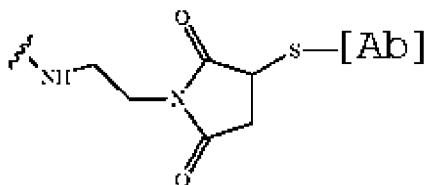
где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

g. малеимидакапроилового соединения следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к другому линкерному элементу, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

h. соединения следующей формулы:



где волнистыми линиями указаны участки присоединения к токсину, и [Ab] означает антитело или его фрагмент,

и где нерасщепляемый линкерный элемент конъюгирован с токсином с помощью амидной связи или эфирной связи.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.2, где линкер дополнительно содержит олигопептидный линкерный элемент, и/или ферментативно расщепляемый линкерный элемент, и/или спейсерный элемент.

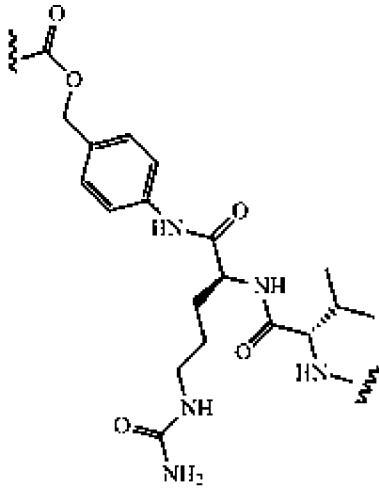
4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.3, где один олигопептидный линкерный элемент содержит олигопептидный мотив распознавания сортазой, выбранный из: -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXAG<sub>m</sub>-, -LPXSG<sub>m</sub>-, -LAXTG<sub>m</sub>-, -LPXTG<sub>m</sub>-, -LPXTA<sub>m</sub>-, -NPQTG<sub>m</sub>- или -NPQTN<sub>m</sub>-, при этом G<sub>m</sub> является олигоглицином, где m является целым числом от ≥1 до ≤21, A<sub>m</sub> является олигоаланином, где m является целым числом от ≥1 до ≤21, N<sub>m</sub> является олигоаспарагином, где m является целым числом от ≥1 до ≤21, и X является любой возможной аминокислотой, предпочтительно, олигопептидный мотив распознавания сортазой является -LPQTGG- или -LPETGG-, предпочтительно, где олигопептидный линкерный элемент содержит:

a. последовательность SEQ ID NO:131 или

b. последовательность SEQ ID NO:132.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.3 или п.4, где ферментативно расщепляемый линкерный элемент содержит линкер val-cit-PAВ в соответствии с соединением следующей формулы:





где волнистыми линиями указаны участки присоединения к другим линкерными элементами.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.3-5, где спейсерный элемент содержит гибкий олигопептид, предпочтительно, где гибкий олигопептид состоит из G и S, более предпочтительно, где гибкий олигопептид является  $(GGGGS)_o$ , где o составляет 1, 2, 3, 4 или 5.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-6, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:

a. A-([олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [LPXTGG]-[этилендиамина] и



ii. [LPXTGG]-[];

b. A-([олигопептидный линкерный элемент-ферментативно расщепляемый линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент] - T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилэтилендиамина] и

ii. [LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина];

c. A-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

i. [GGGGS]-[LPXTGG]-[этилендиамина] и



ii. [GGGGS]-[LPXTGG]-[]; или

d. A-([спейсерный элемент-олигопептидный линкерный элемент-ферментативно

расщепляемый линкерный элемент-нерасщепляемый линкерный элемент]-T)<sub>n</sub>, и предпочтительно, где линкер выбран из:

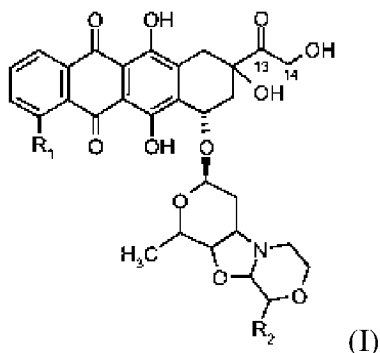
- i. [GGGGG]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[N-формил-N, N'-диметилендиамин] и
- ii. [GGGGG]-[LPXTGG]-[vc-PAB]-[пиперазина].

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.7, где нерасщепляемый линкерный элемент является этилендиамином, и где олигопептидный линкерный элемент является LPXTGG, где X является Q или E, предпочтительно, где X является Q.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-8, где

- a. (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями антитела,
- b. (L-T) ковалентно связан с обеими тяжелыми цепями антитела, или
- c. (L-T) ковалентно связан с обеими легкими цепями и обеими тяжелыми цепями антитела.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-9, где производное антрациклина имеет следующую формулу (I) и ковалентно связано с нерасщепляемым линкерным элементом с помощью C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы, или ковалентно связано с нерасщепляемым линкерным элементом с помощью гидроксильной группы на C<sub>14</sub>:



и где R<sub>1</sub> является атомом водорода, гидроксигруппой или метоксигруппой,

и где R<sub>2</sub> является C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-алкоксигруппой, предпочтительно, где производное антрациклина является производным 3'-деамино-3'',4'-ангидро-[2''(S)-метокси-3''(R)-окси-4''-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682).

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-10, где A, антитело или его фрагмент, содержит:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно;

d. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

e. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

f. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

g. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:11, соответственно;

h. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно; или

i. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно.

12. Конъюгат антители-лекарственное средство по любому из пп.1-10, где А, антители или его фрагмент, содержит:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:11, соответственно; или

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 и SEQ ID NO:11, соответственно,

предпочтительно, где А, антители или его фрагмент, содержит:

a. последовательность VH SEQ ID NO:27 и последовательность VL SEQ ID NO:28;

b. последовательность VH SEQ ID NO:29 и последовательность VL SEQ ID NO:30;

или

последовательность VH SEQ ID NO:31 и последовательность VL SEQ ID NO:32.

13. Конъюгат антители-лекарственное средство по любому из пп.1-11, где А, антители или его фрагмент, содержит:

a. последовательность VH SEQ ID NO:33 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

b. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

c. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:39;

d. последовательность VH SEQ ID NO:34 и последовательность VL SEQ ID NO:40;

- e. последовательность VH SEQ ID NO:35 и последовательность VL SEQ ID NO:38;
- f. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- g. последовательность VH SEQ ID NO:36 и последовательность VL SEQ ID NO:40;
- h. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:41;
- i. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:38;

или

- j. последовательность VH SEQ ID NO:37 и последовательность VL SEQ ID NO:39, предпочтительно, где A, антитело или его фрагмент, содержит:
  - a. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;
  - b. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;
  - c. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52;
  - d. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;
  - e. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51;
  - f. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54;
  - g. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:53;
  - h. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:54;
  - i. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:51; или
  - j. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO:52

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

14. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-19, где способ включает следующие стадии:

- a. получение A, антитела или его фрагмента, с олигопептидным линкерным элементом, предпочтительно, на C-конце, необязательно с предшествующим спейсерным элементом на легких и/или тяжелых цепях антитела,
- b. получение одного или более токсинов T с нерасщепляемым линкерным элементом, и
- c. конъюгация антитела и токсина, приводящая к получению конъюгата антитело-лекарственное средство.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из:

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной

последовательности SEQ ID NO:46 и двух легких цепей с аминокислотной последовательности SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамина] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3",4'-ангидро-[2"(S)-метокси-3"(R)-окси-4"-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы; или

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:133 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

линкера [GGGGS]-[LPQTGG]-[этилендиамина] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3",4'-ангидро-[2"(S)-метокси-3"(R)-окси-4"-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы; или

антитела, состоящего из двух тяжелых цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:134 и двух легких цепей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:51, где антитело связывается с CLDN18.2,

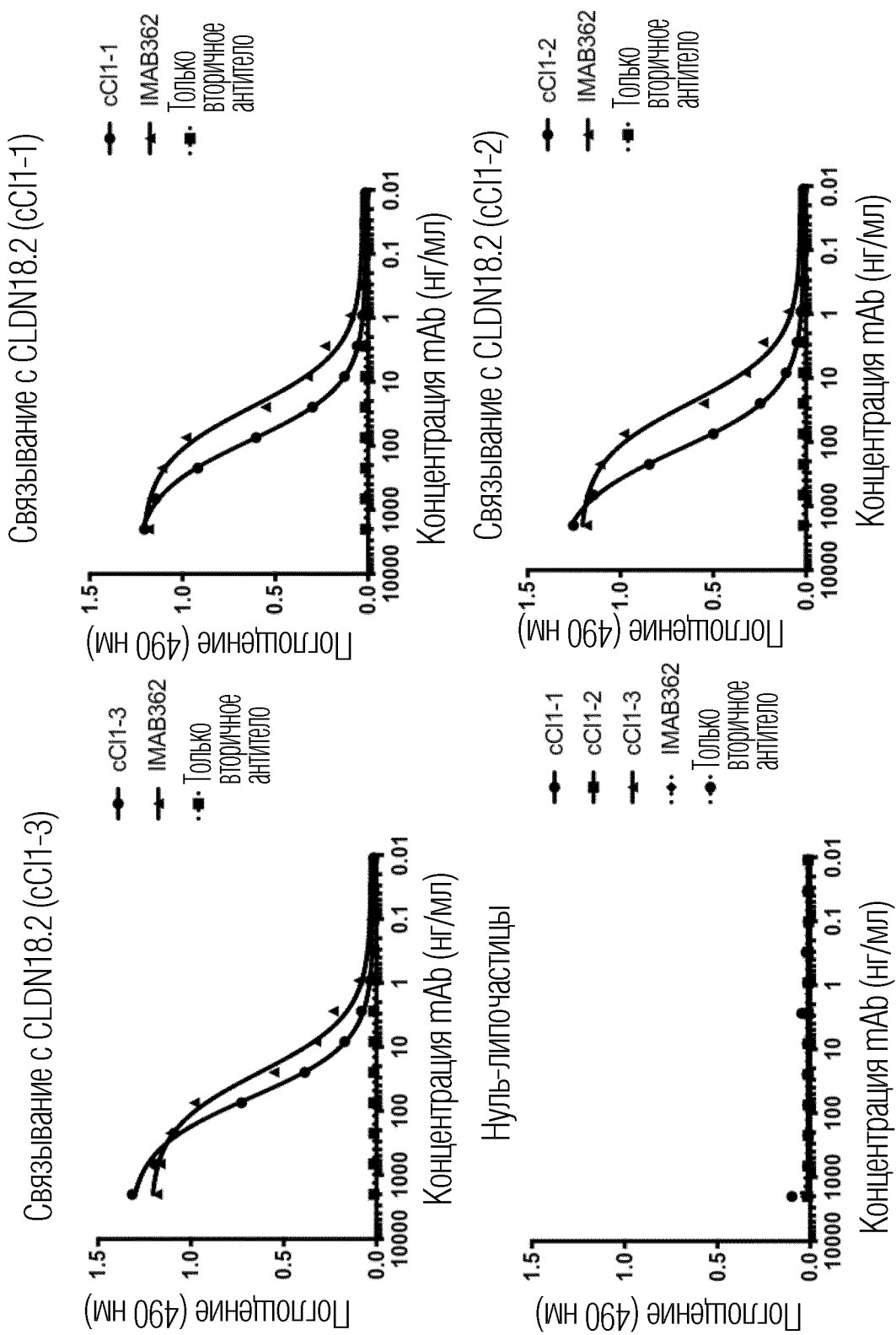
линкера [GGGGS]-[LPQXTGG]-[этилендиамина] на С-конце легких цепей и низкомолекулярного токсина на основе антрациклина 3'-деамино-3",4'-ангидро-[2"(S)-метокси-3"(R)-окси-4"-морфолинил]доксорубицина (PNU-159682), ковалентно связанного с этилендиамином линкера в C<sub>13</sub>, что приводит к утрате C<sub>14</sub> и гидроксильной группы.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-15 и эксципиент.

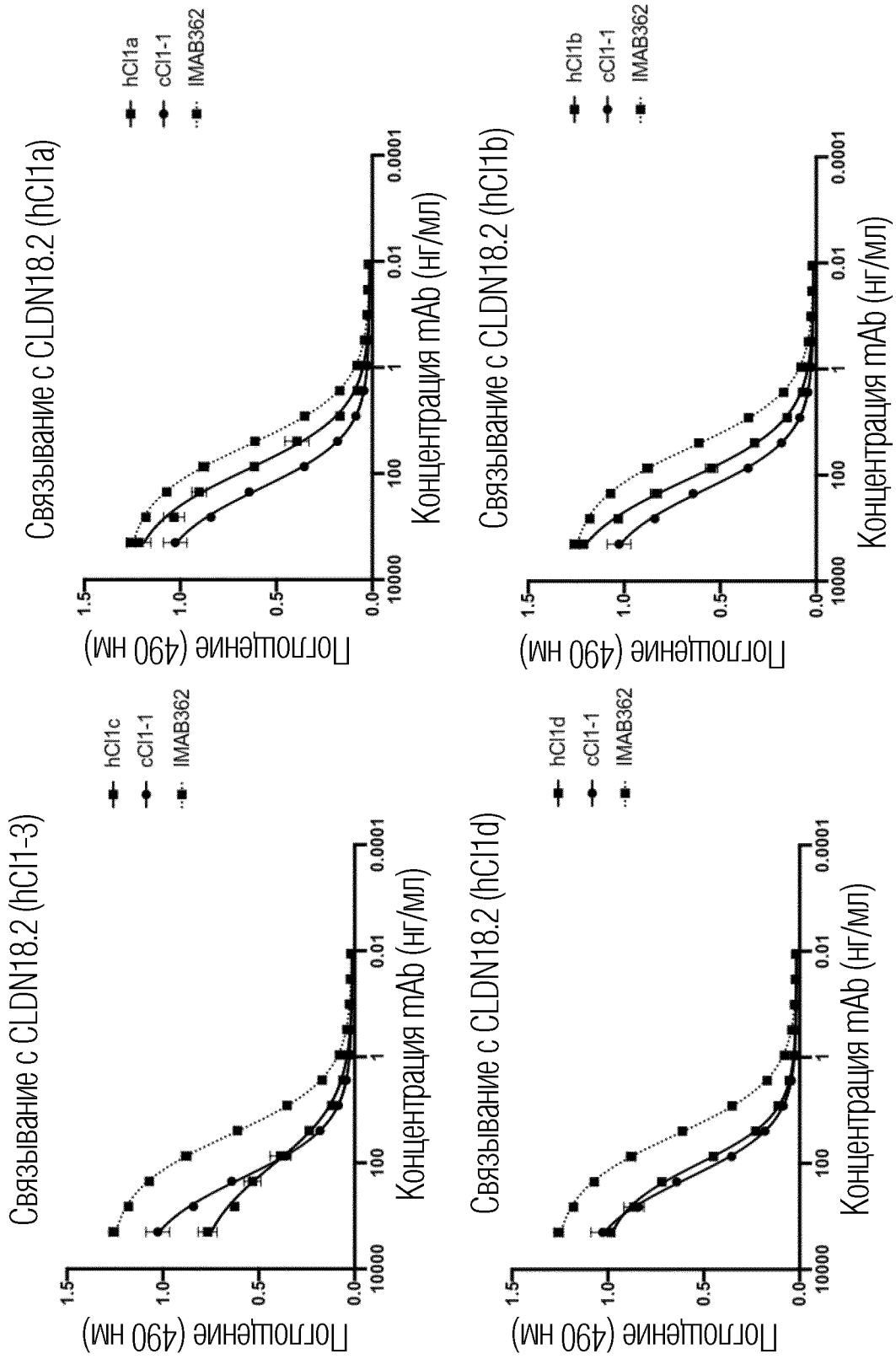
17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-15 для применения в лечении.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-15 для применения в лечении злокачественного новообразования, предпочтительно, где злокачественное новообразование выбрано из рака поджелудочной железы, желудка, пищевода, яичников и легких.

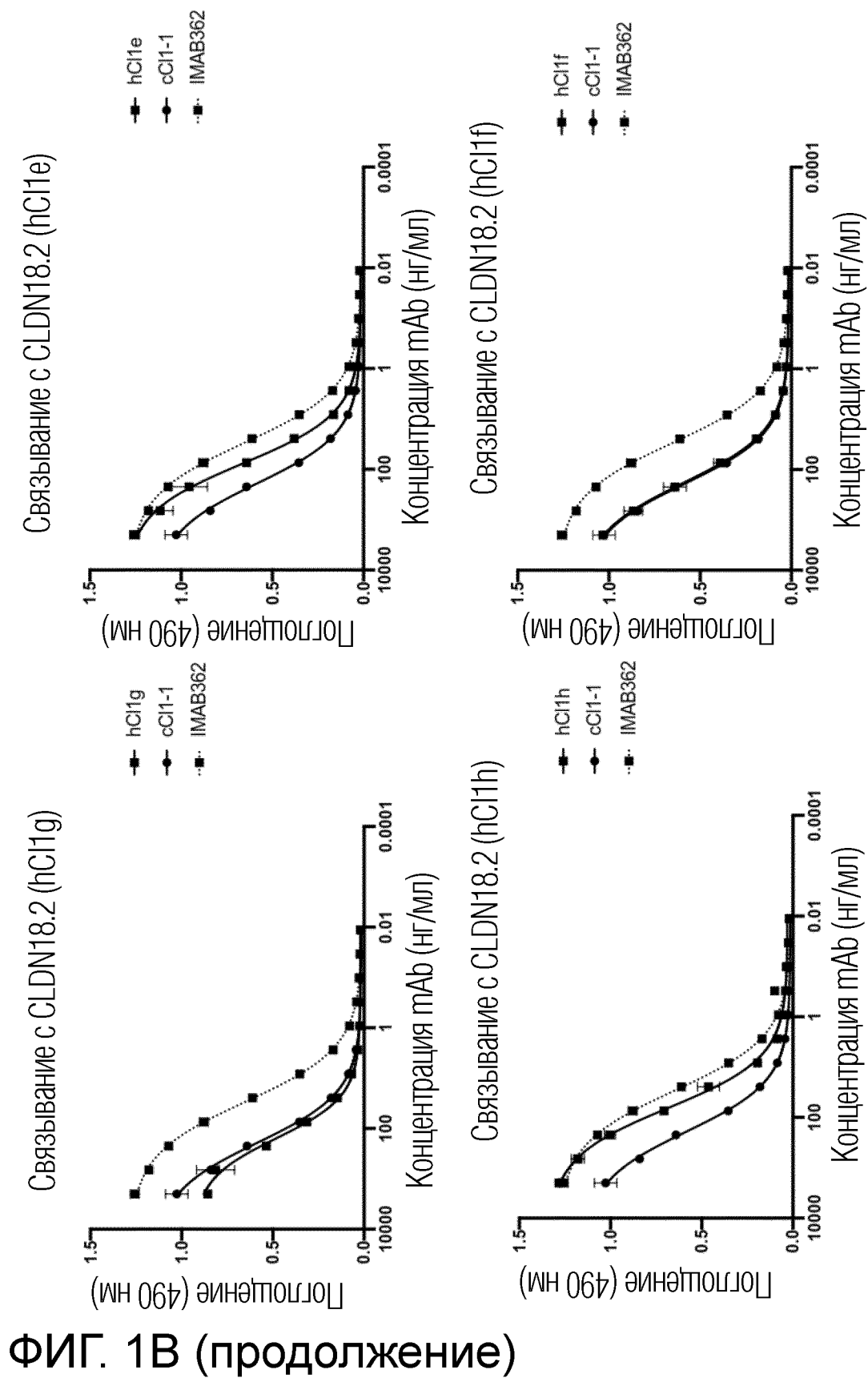
По доверенности



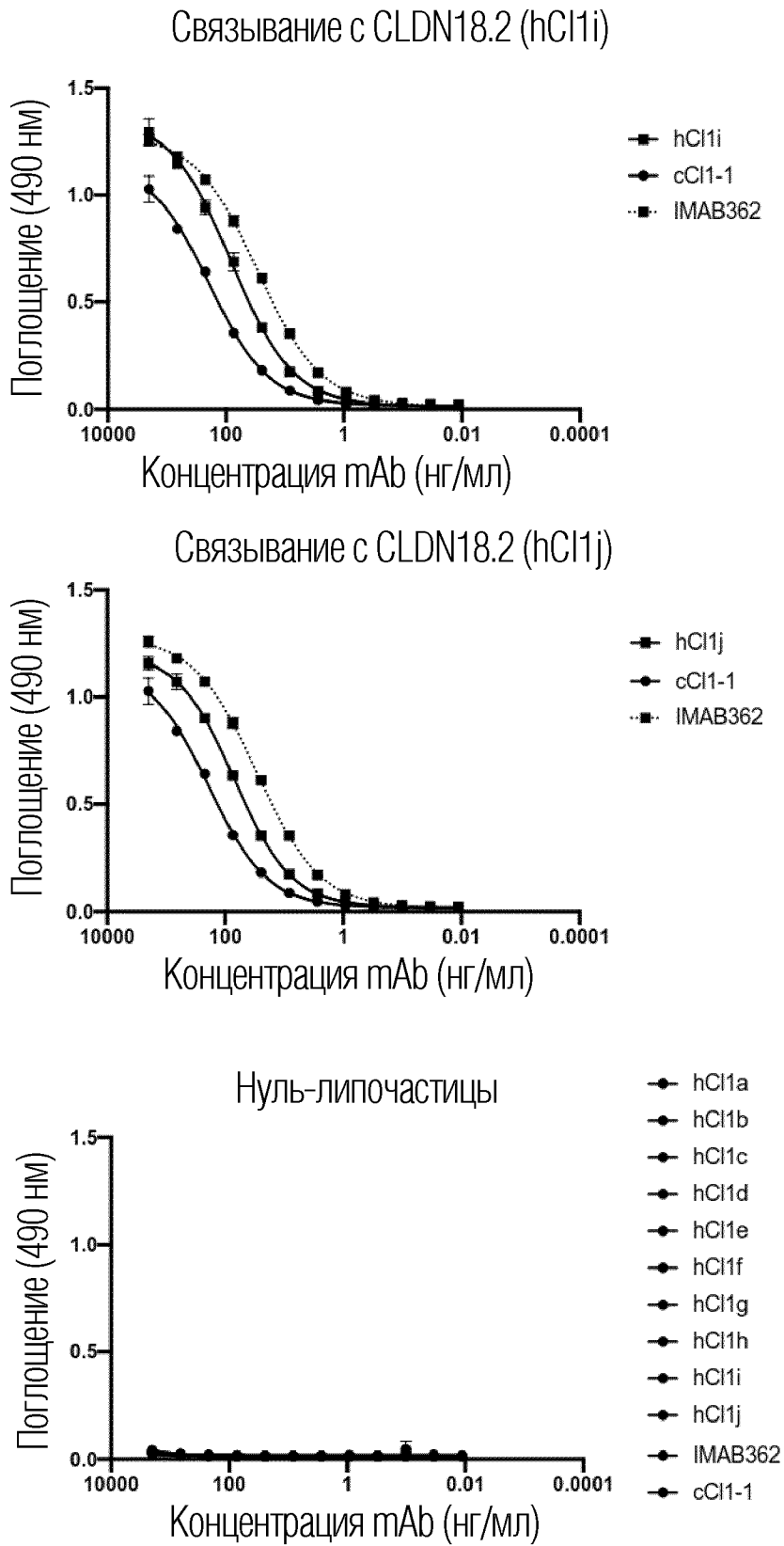
ФИГ. 1А



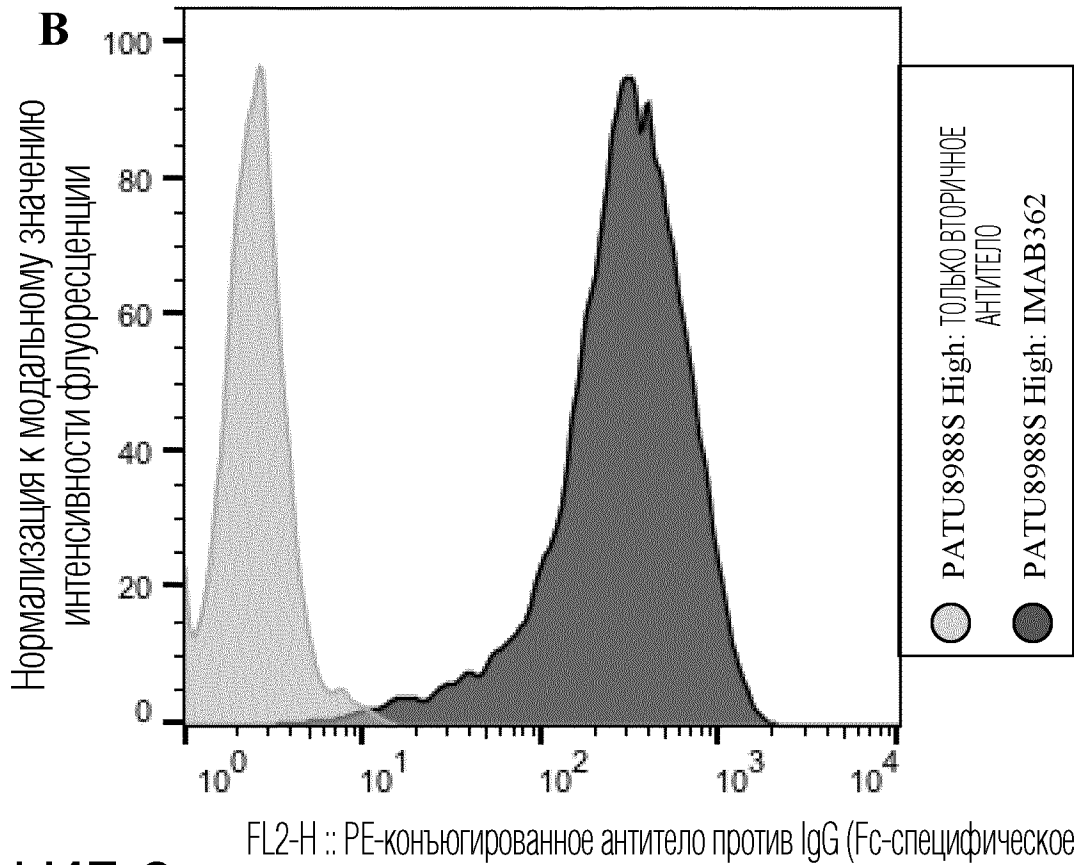
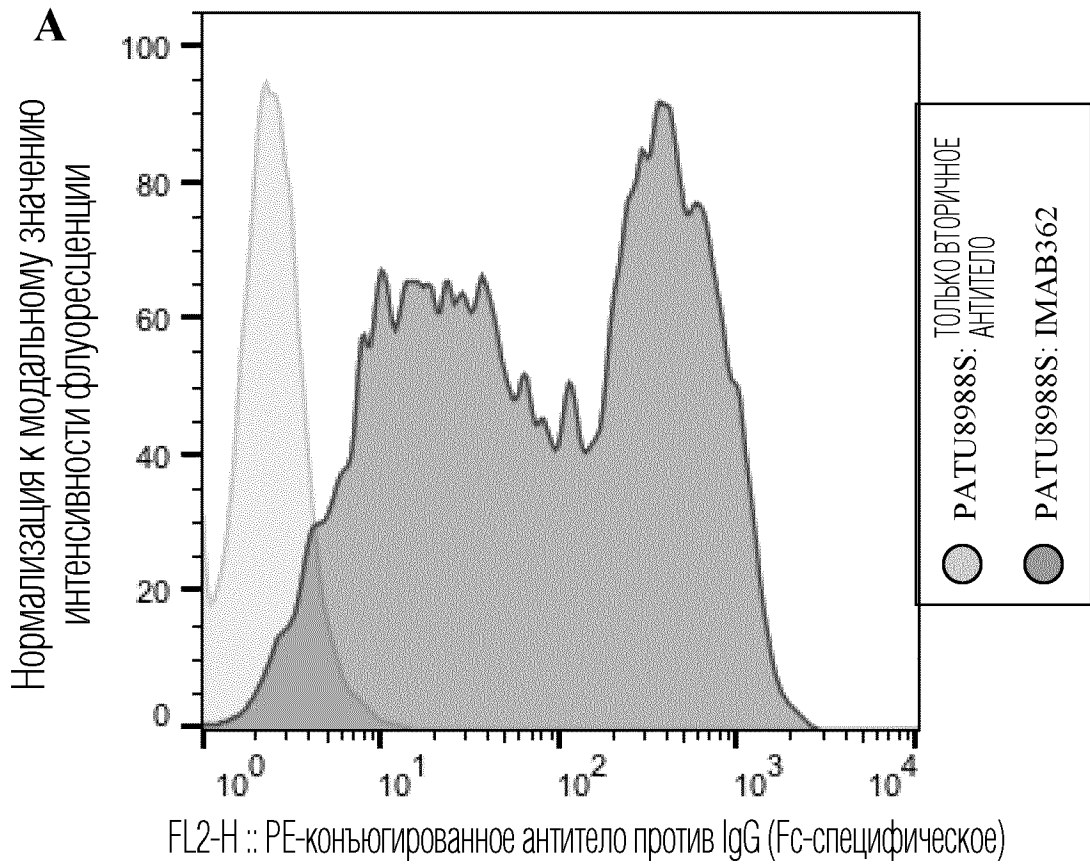
ФИГ. 1В



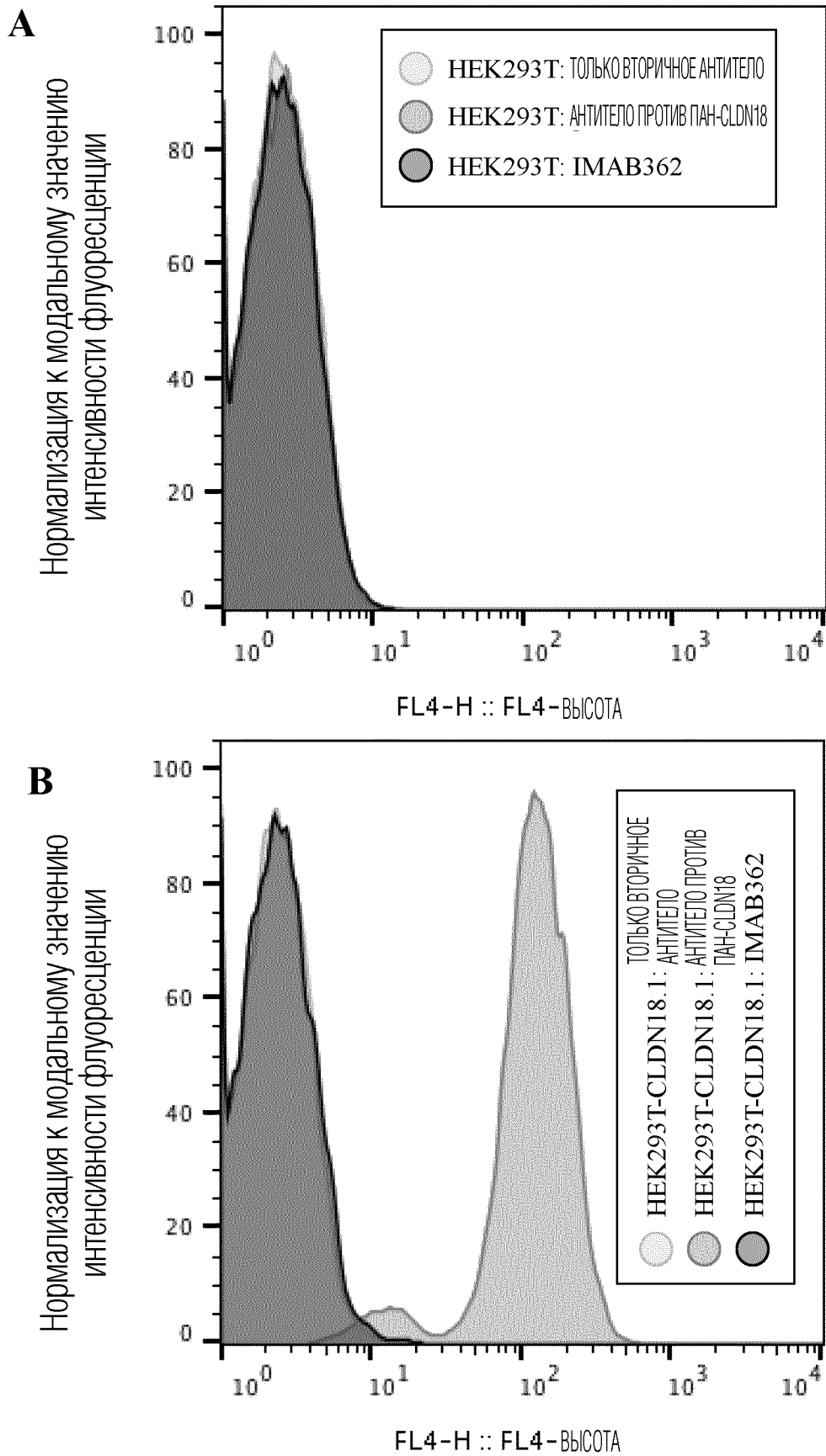




ФИГ. 1В

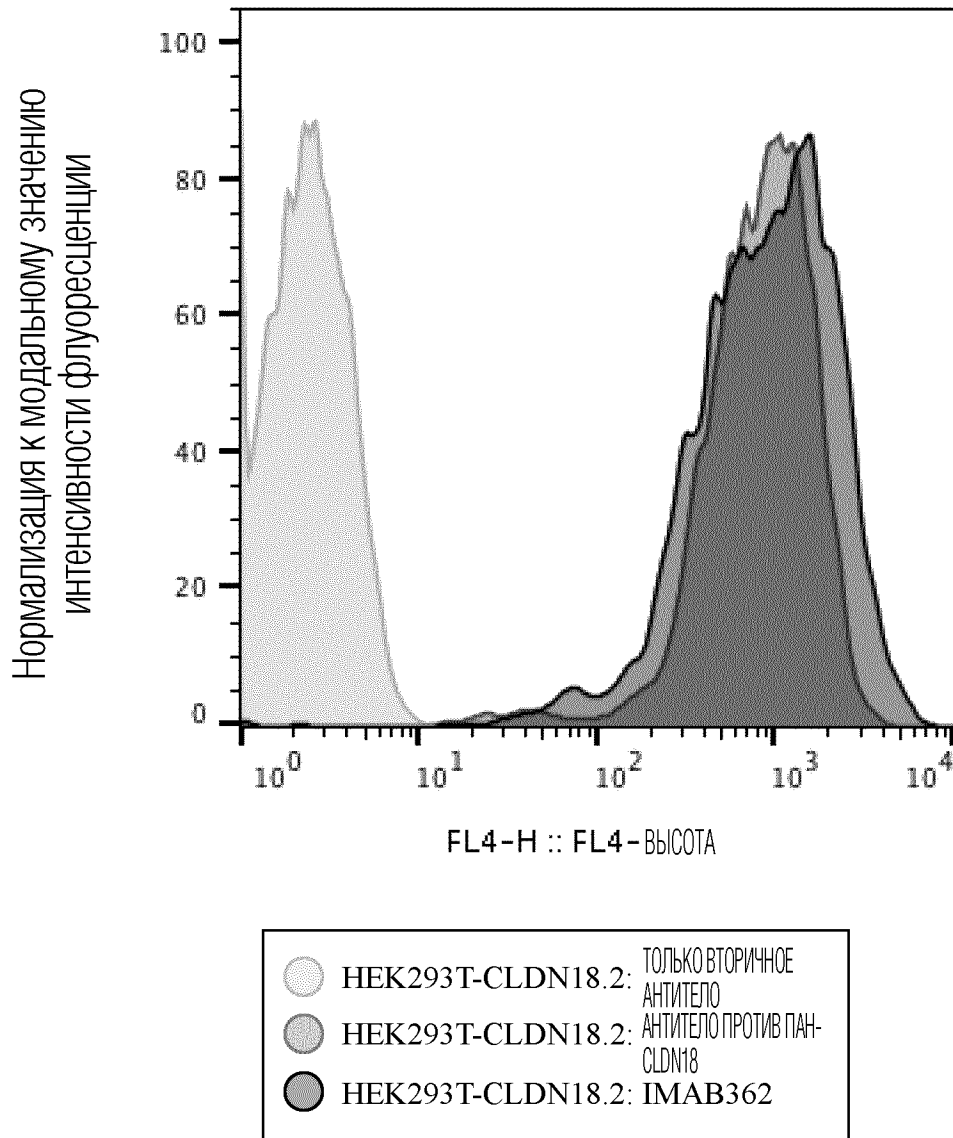


ФИГ. 2

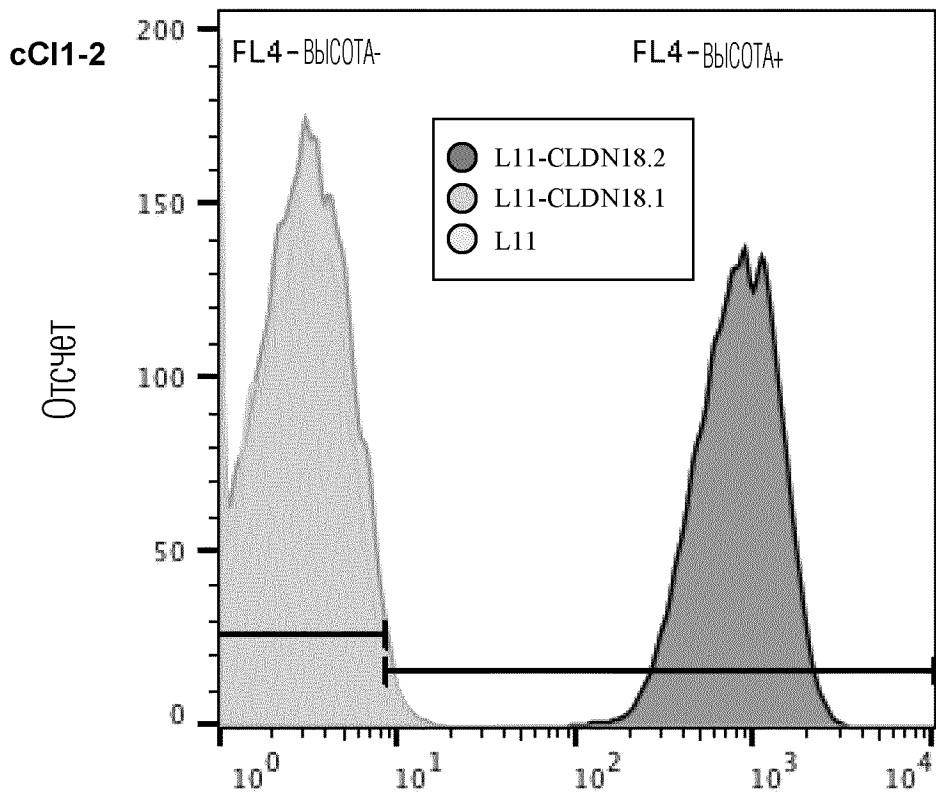
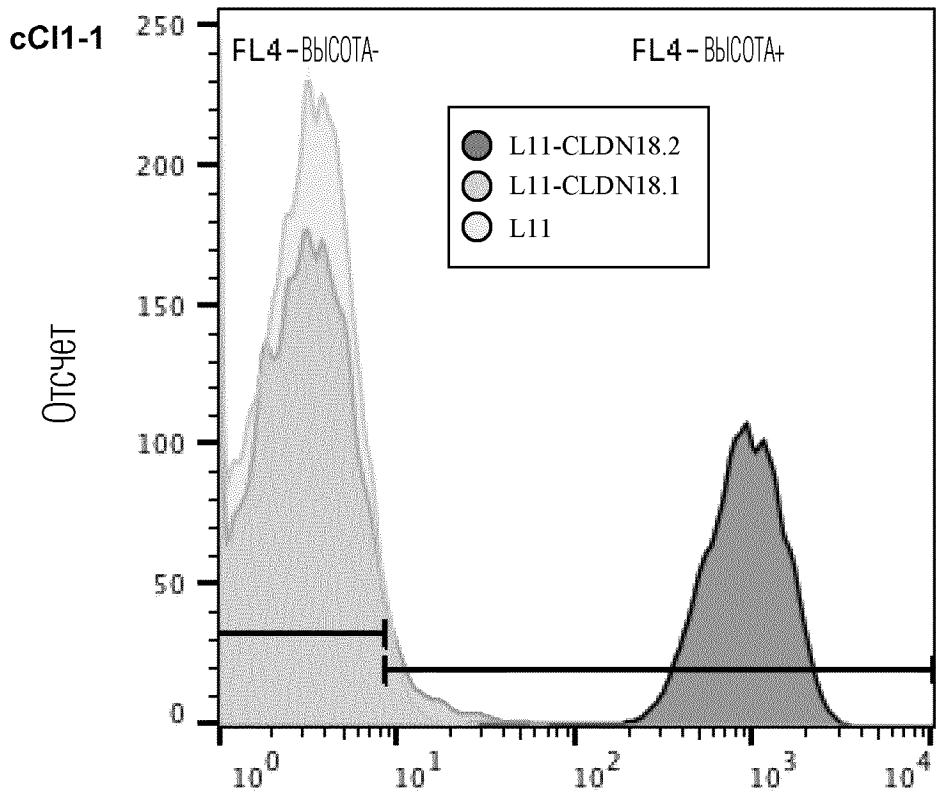


ФИГ. 3

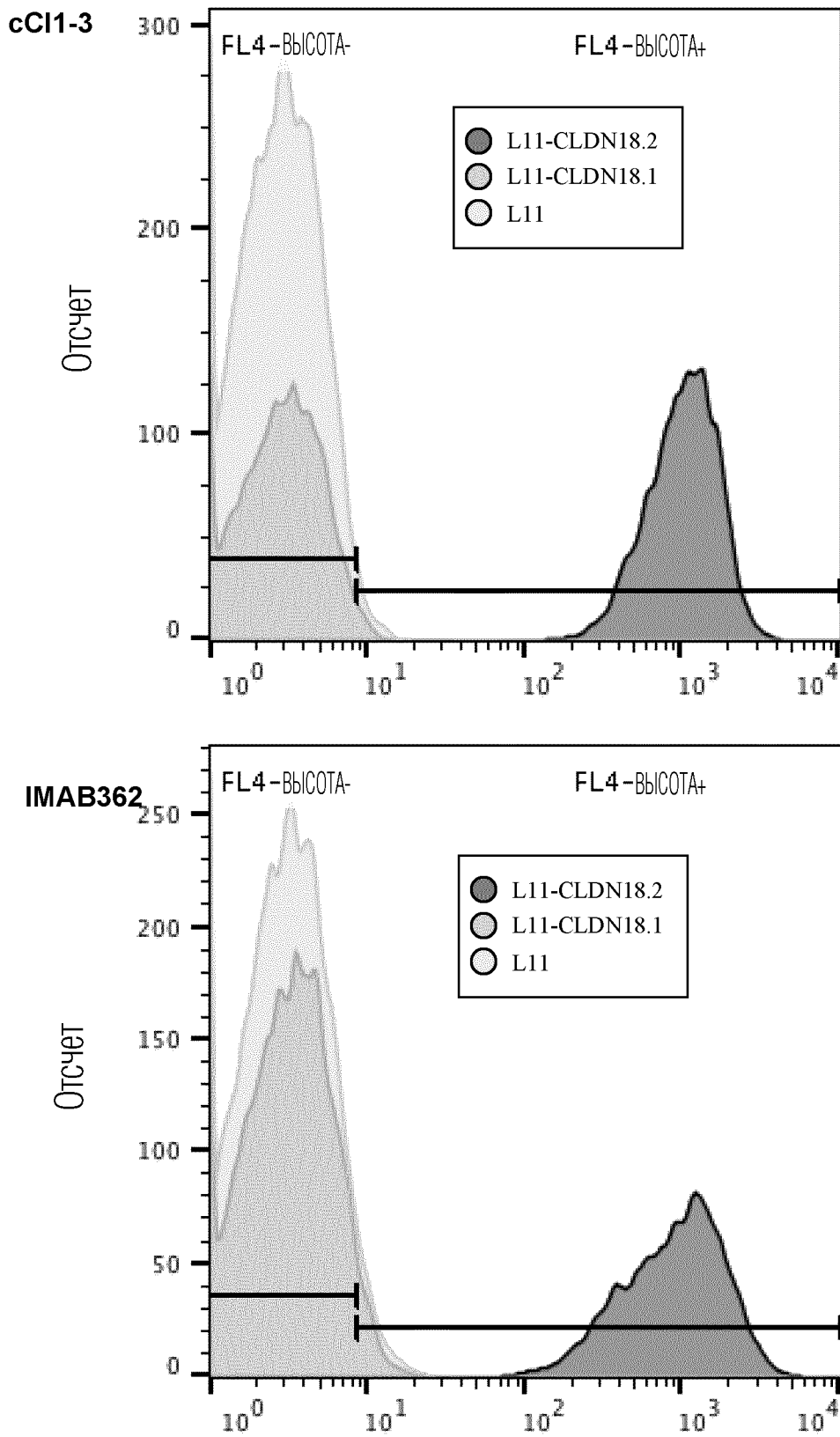
С



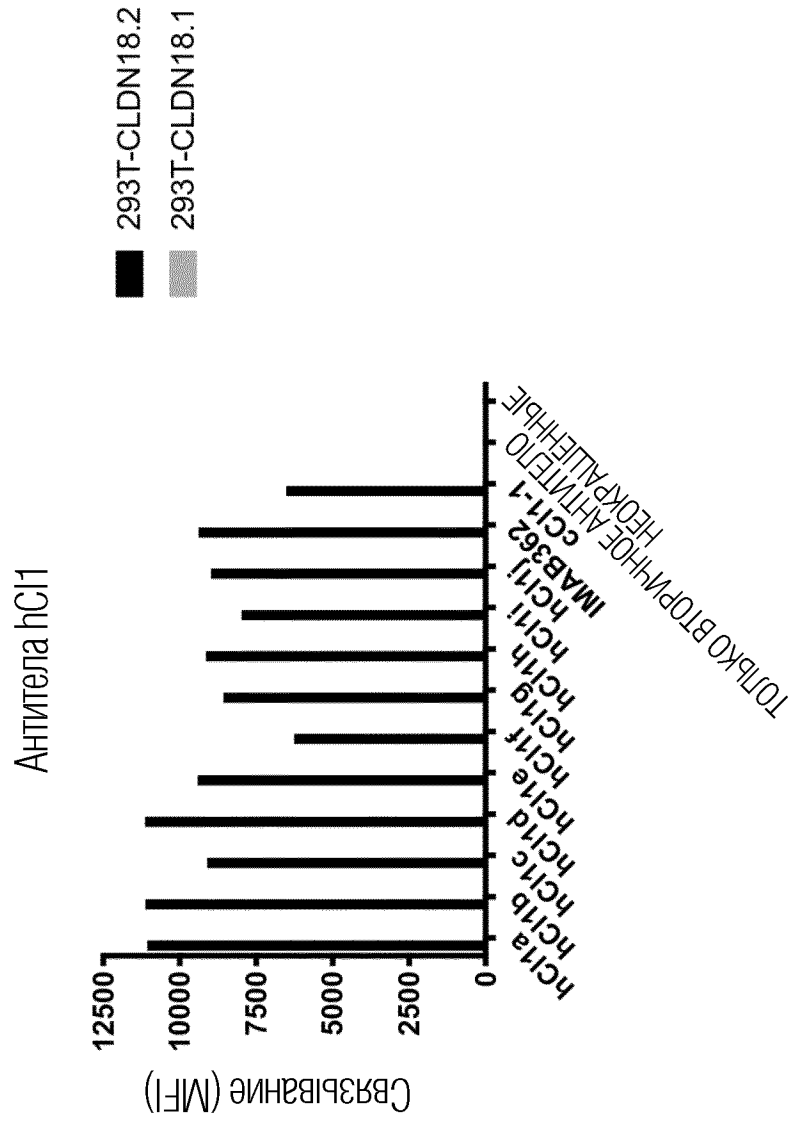
ФИГ. 3



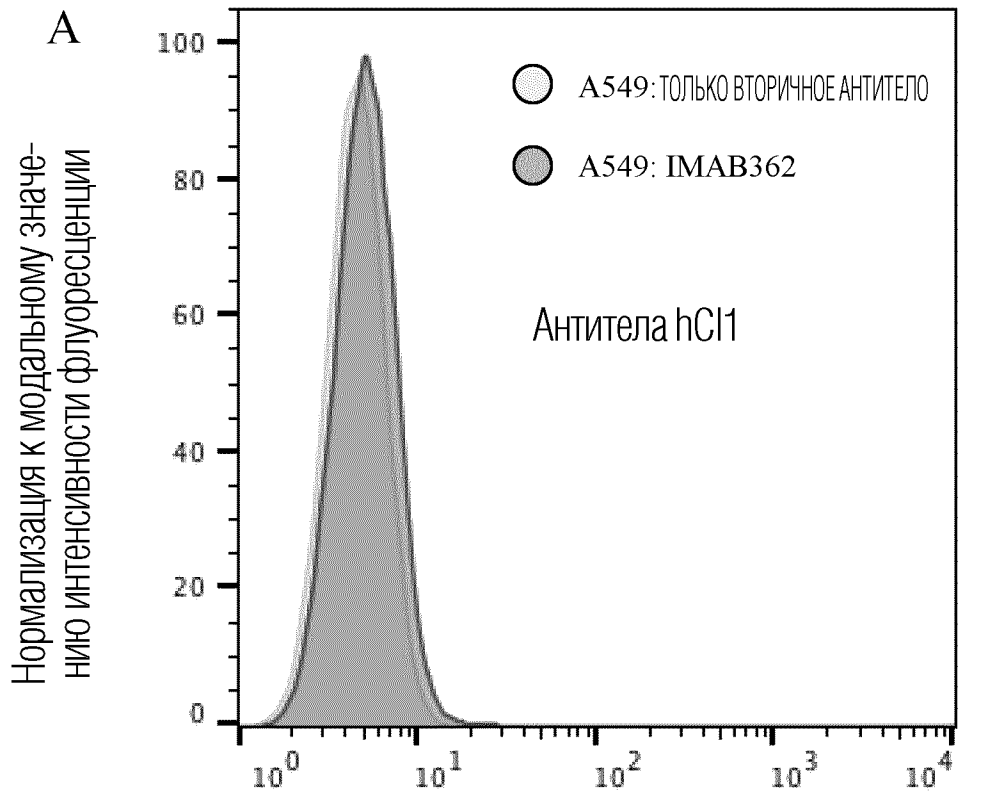
ФИГ. 4



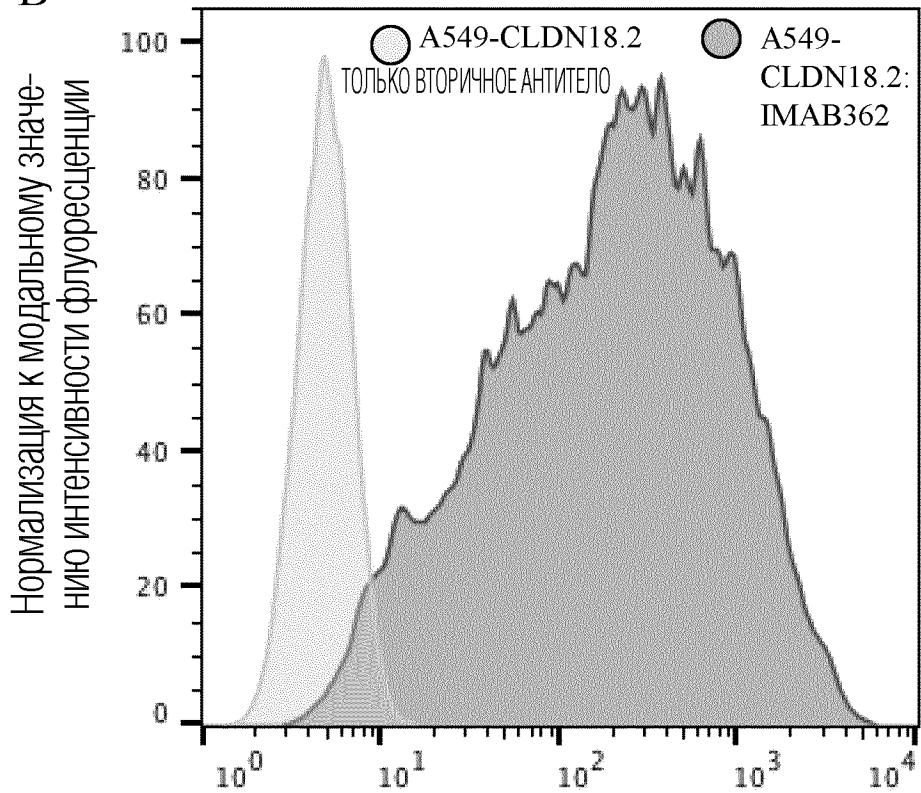
ФИГ. 4



ФИГ. 5



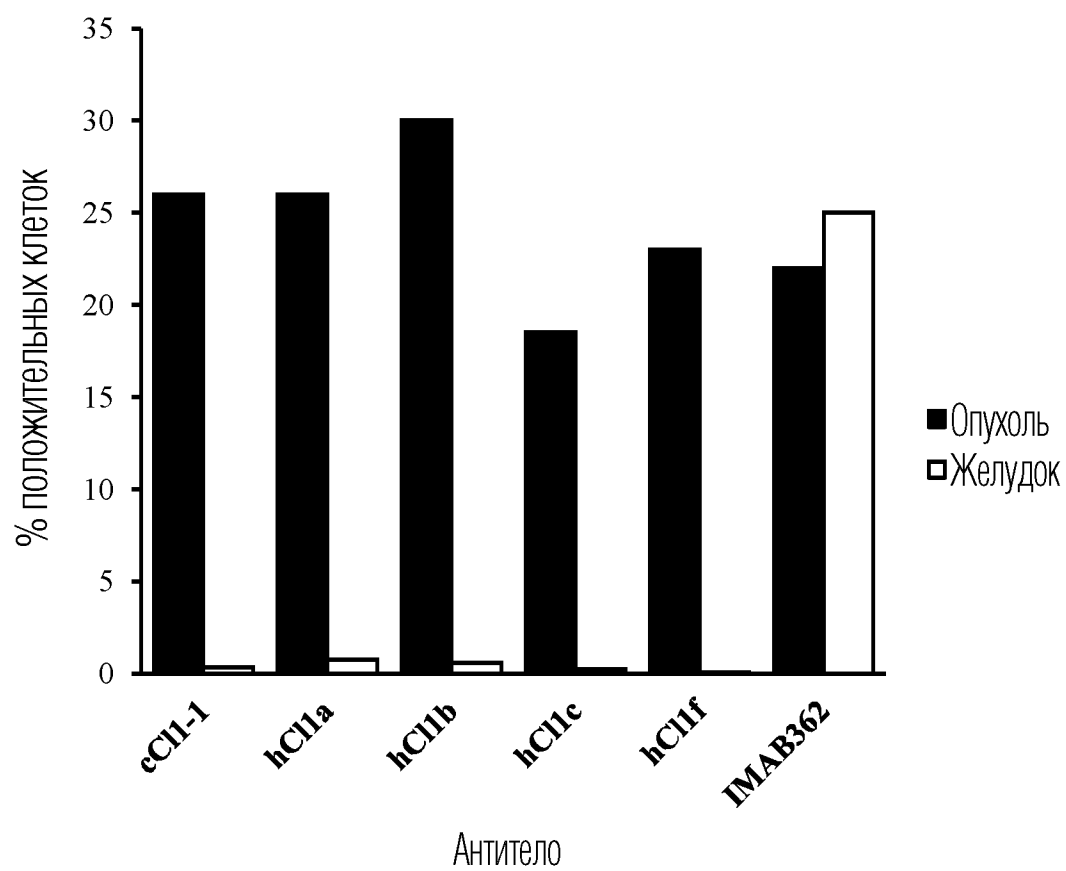
**B** FL2-H :: PE-конъюгированное антитело против IgG (Fc-специфическое)



**ФИГ. 6**

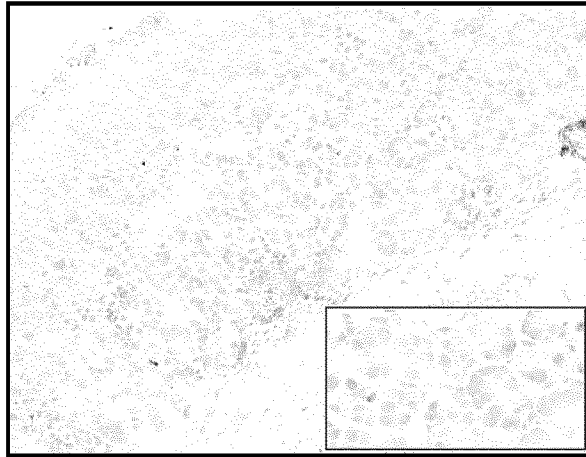
FL2-H :: PE-конъюгированное антитело против IgG (Fc-специфическое)



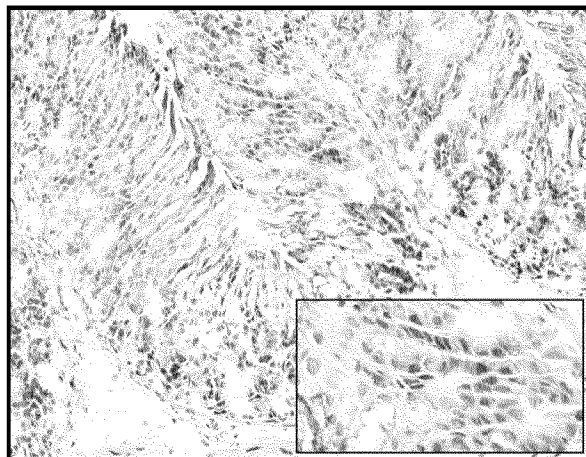


ФИГ. 7

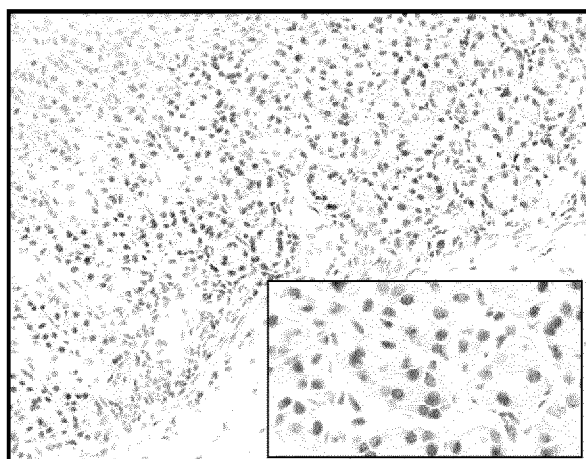
**A**



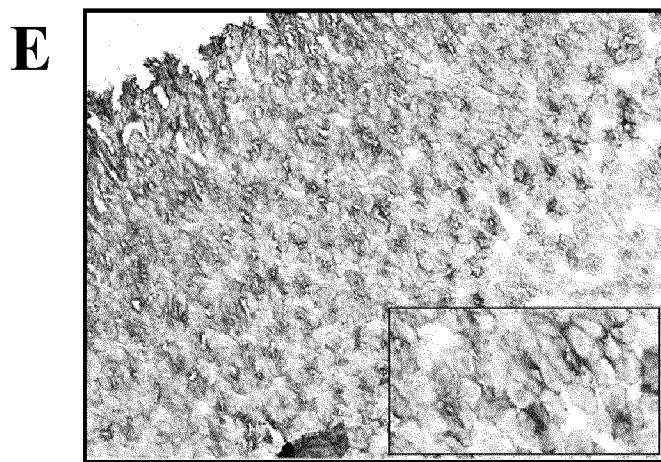
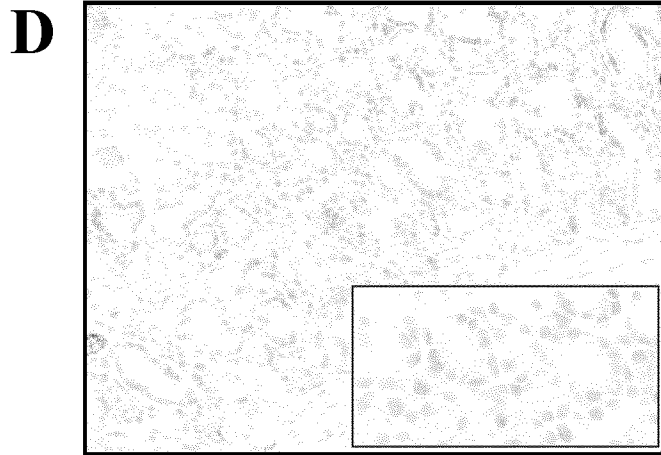
**B**



**C**

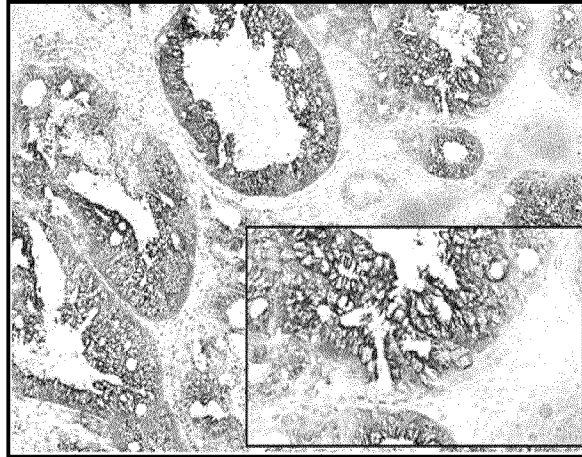


**ФИГ. 8**

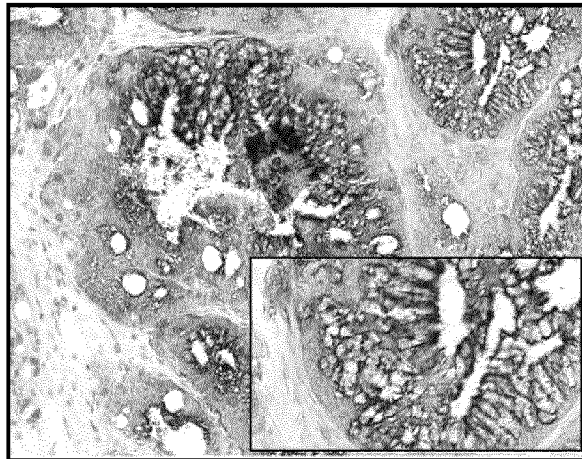


ФИГ. 8

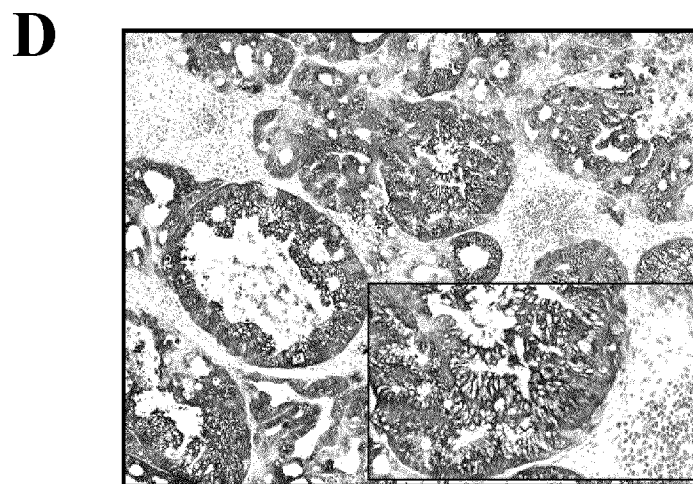
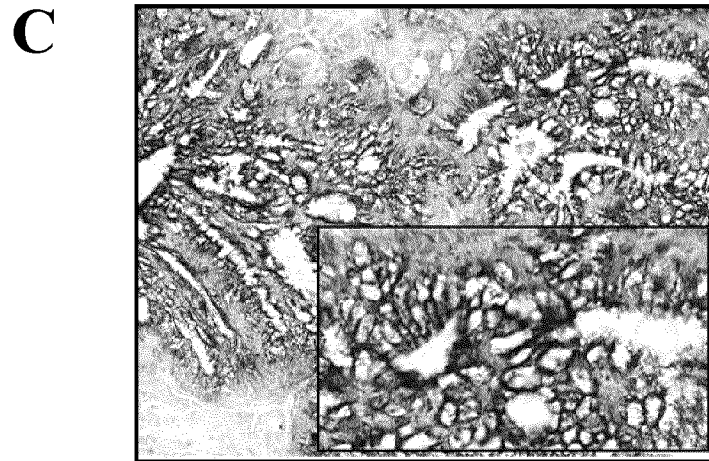
**A**



**B**



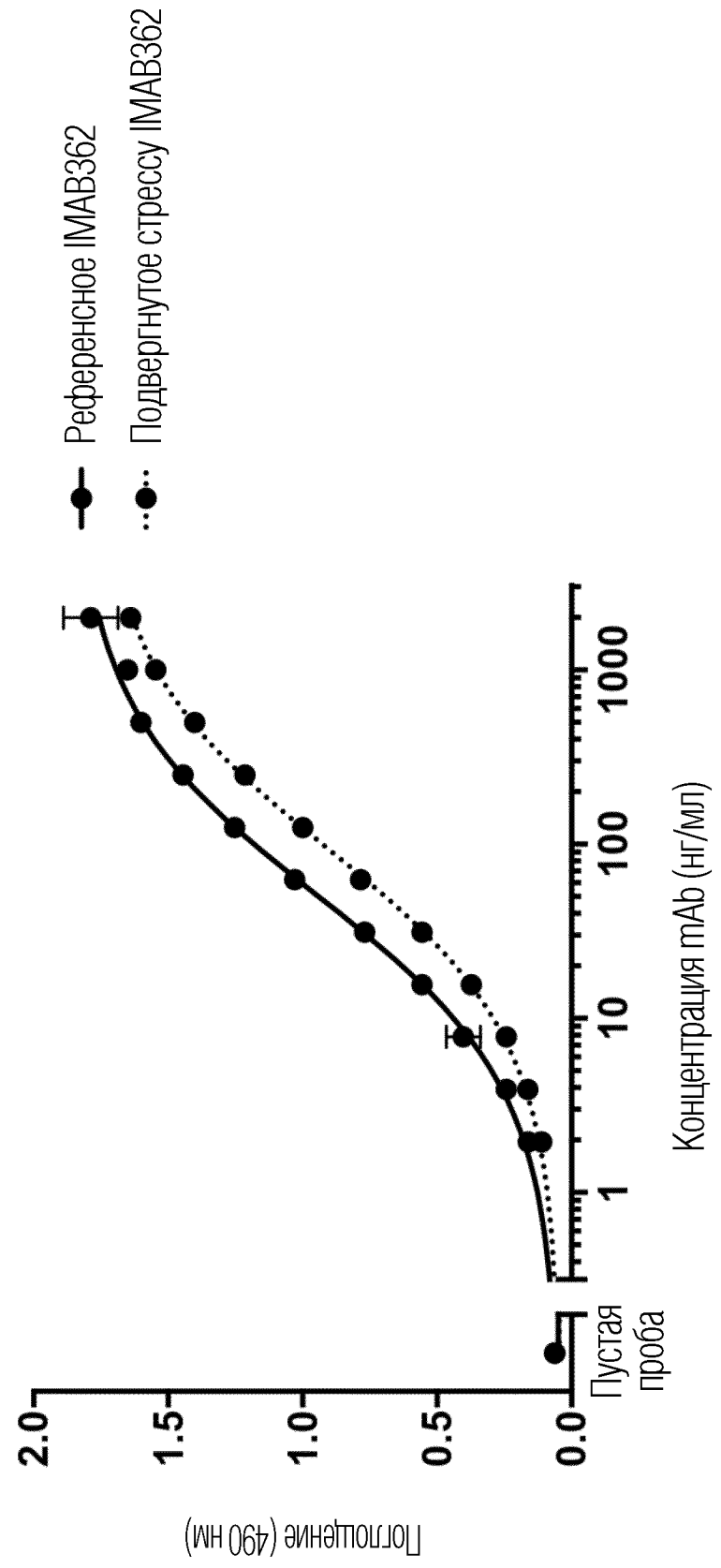
**ФИГ. 9**



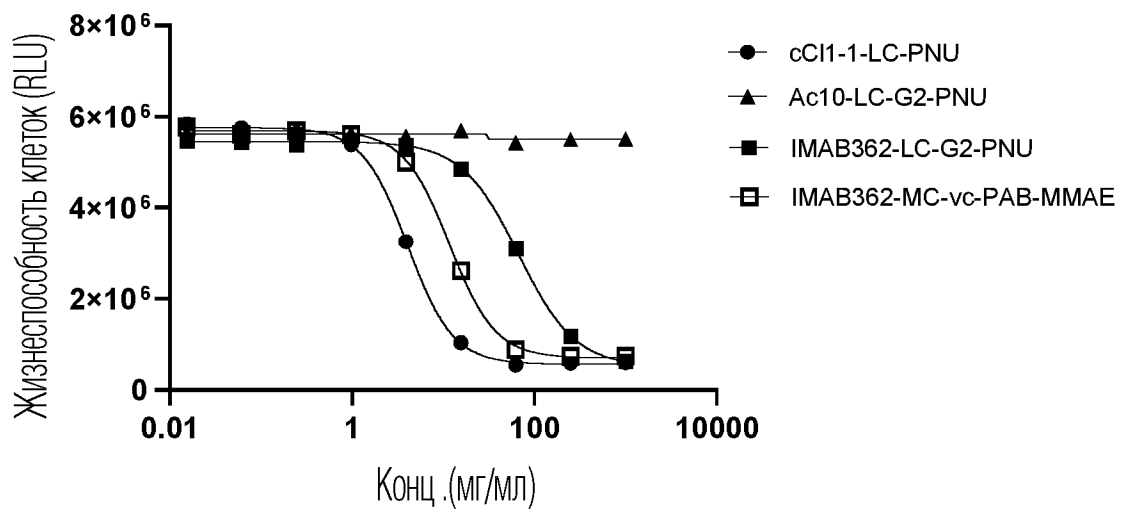
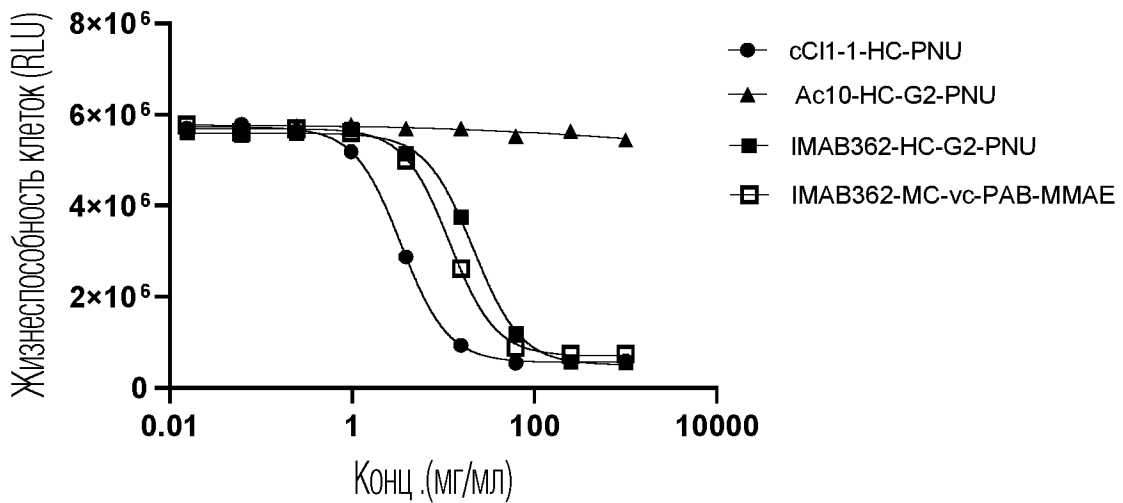
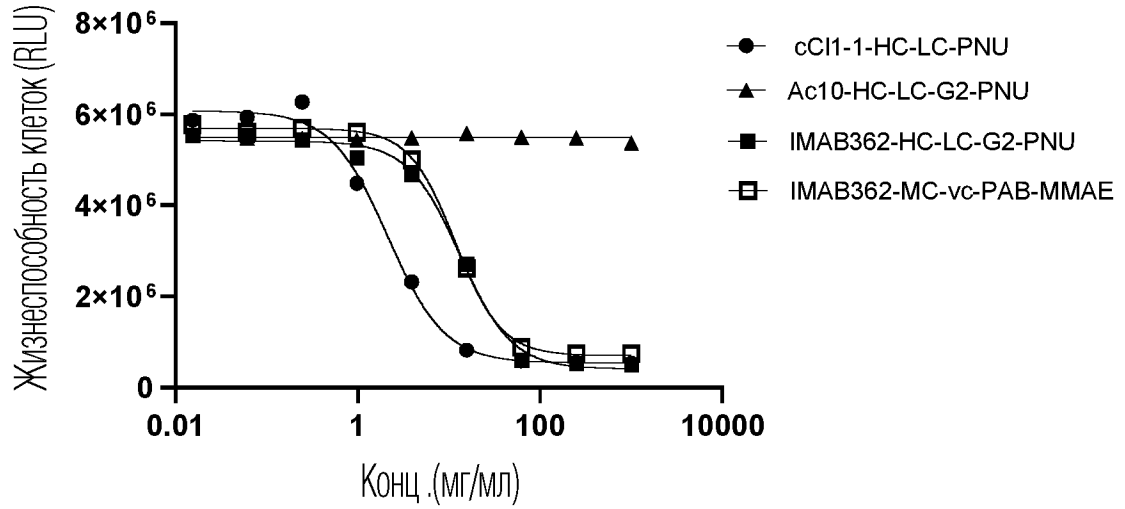
ФИГ. 9

ФИГ. 10

Стрессовый тест Asп-дезамидирования: связывание с CLDN18.2

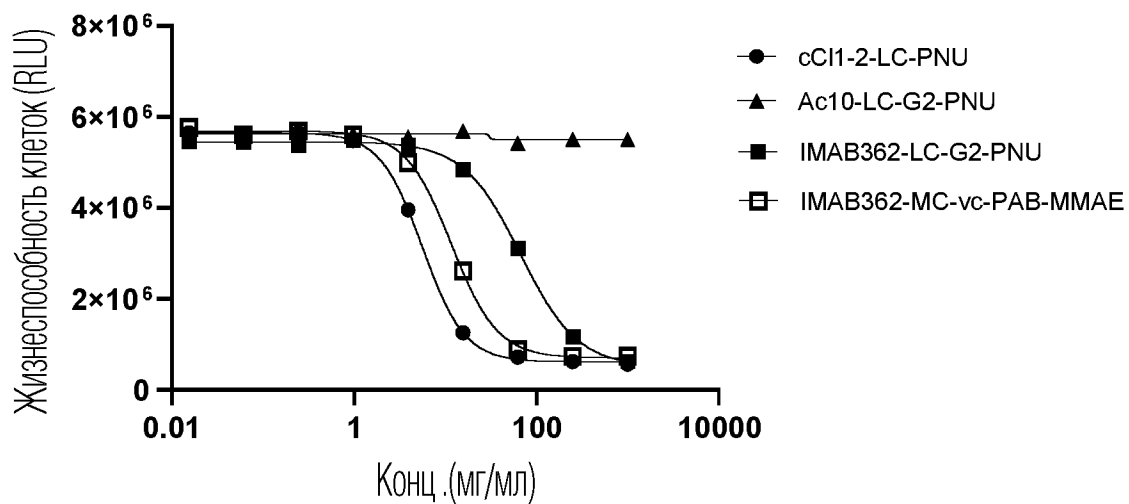
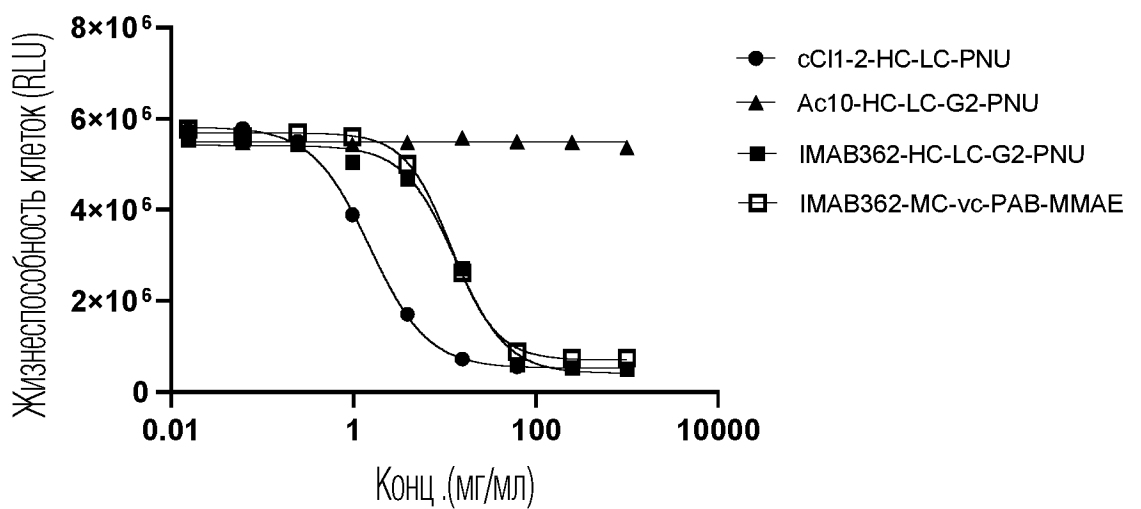


## HEK293T-CLDN18.2



ФИГ. 11А

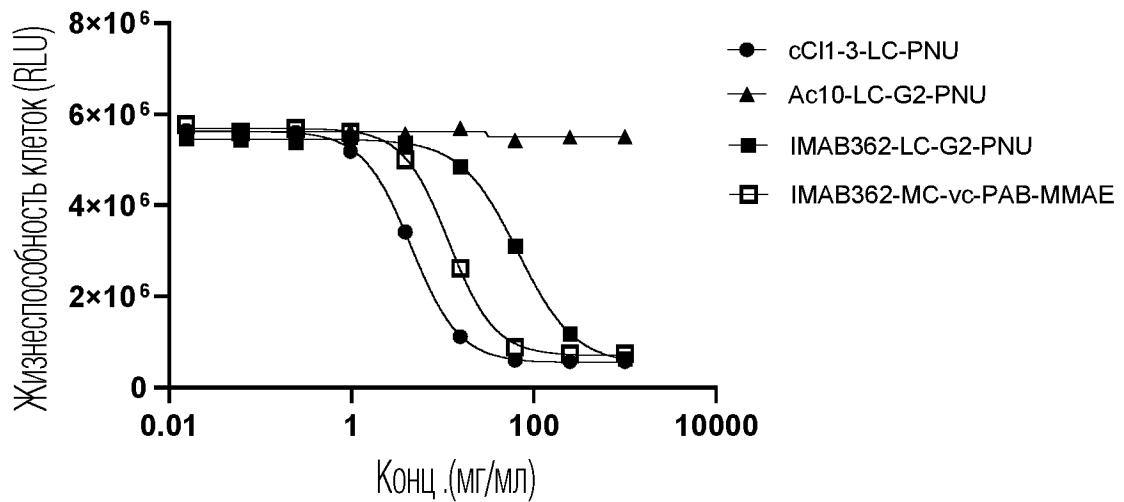
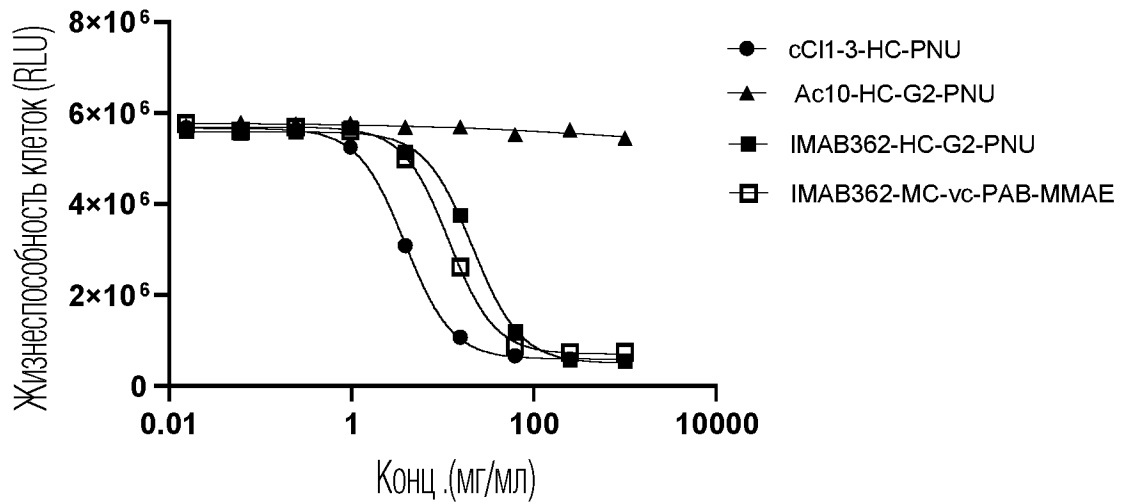
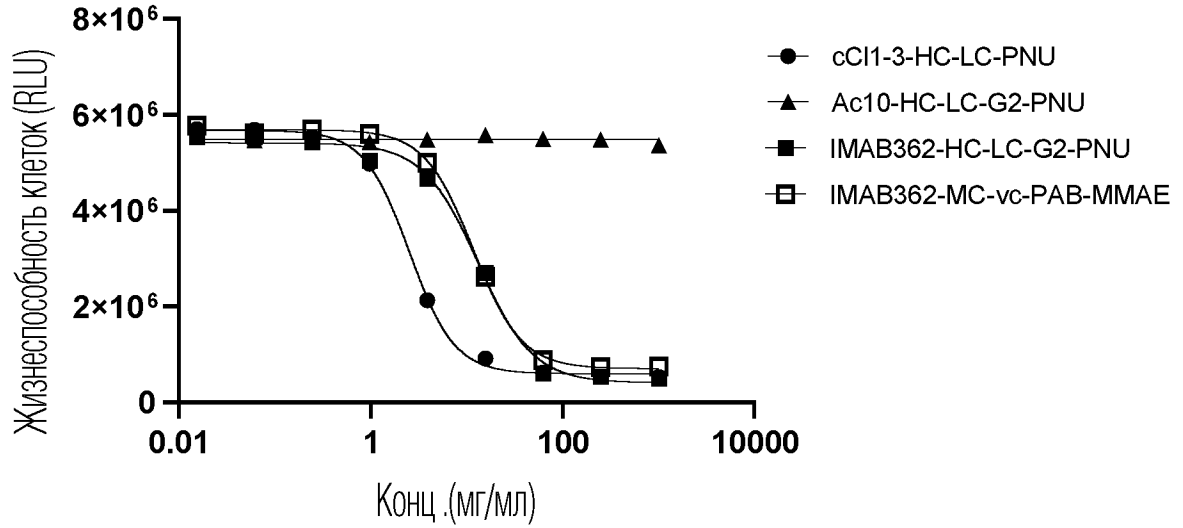
## HEK293T-CLDN18.2



ФИГ. 11В

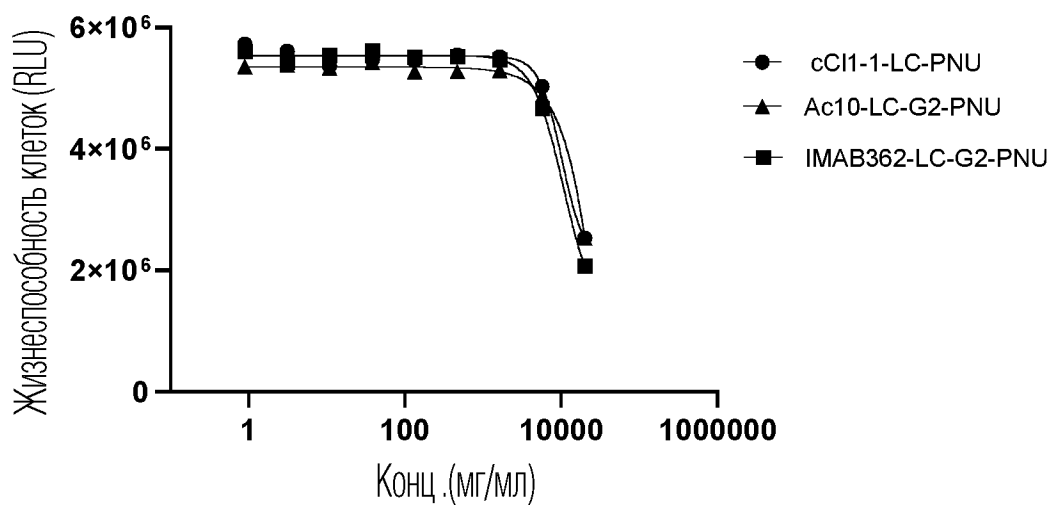
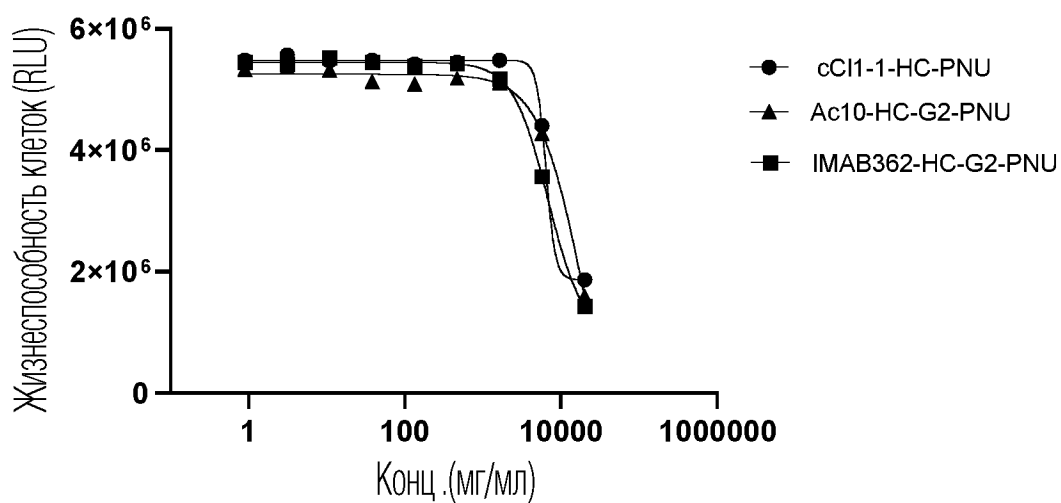
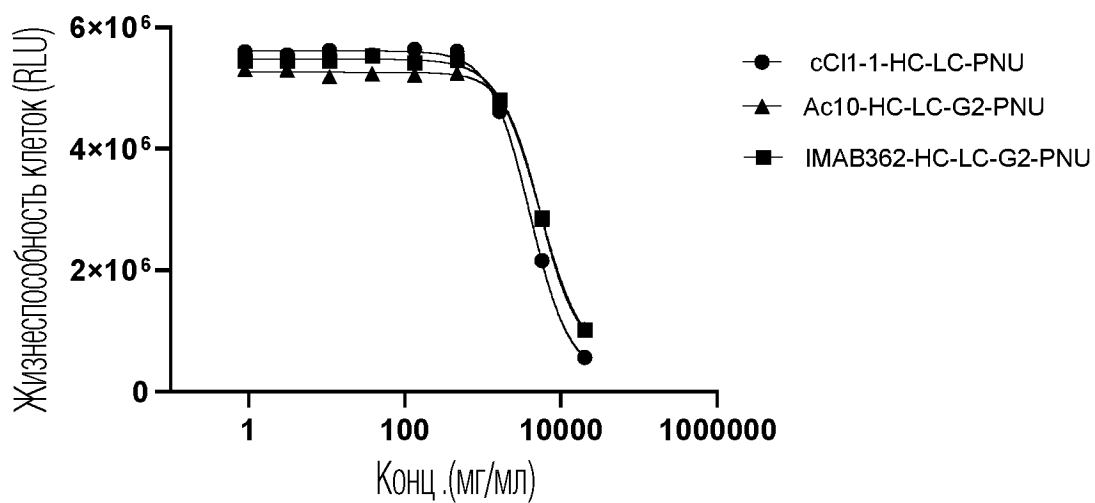


## HEK293T-CLDN18.2



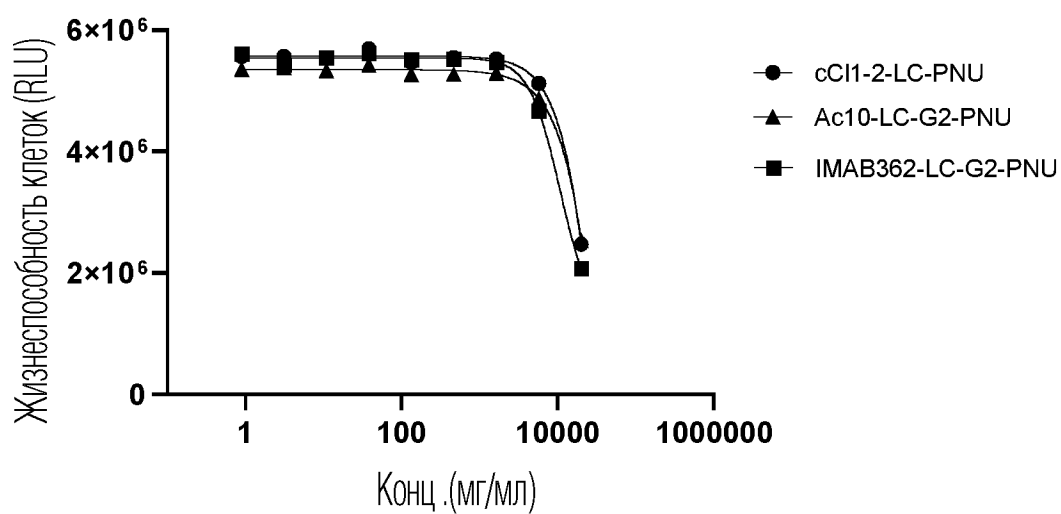
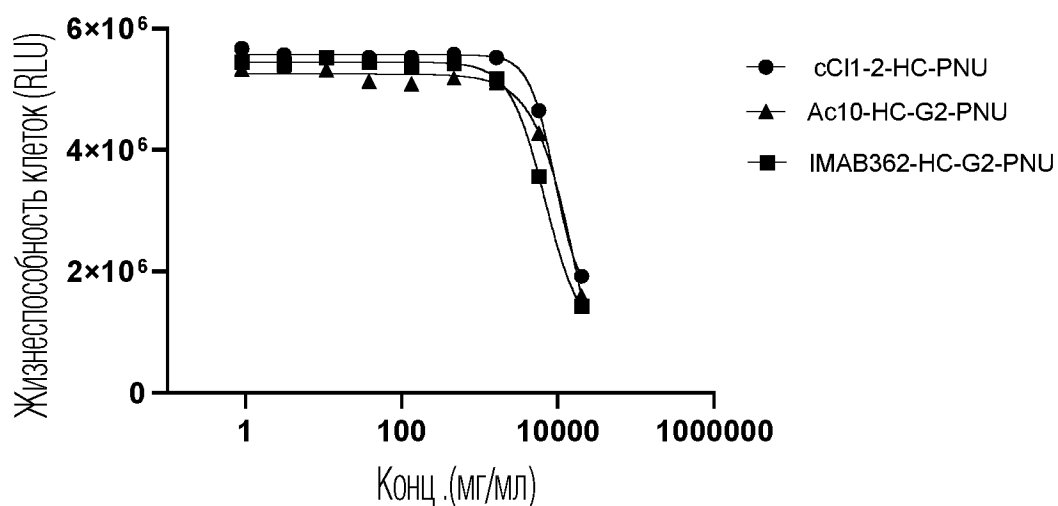
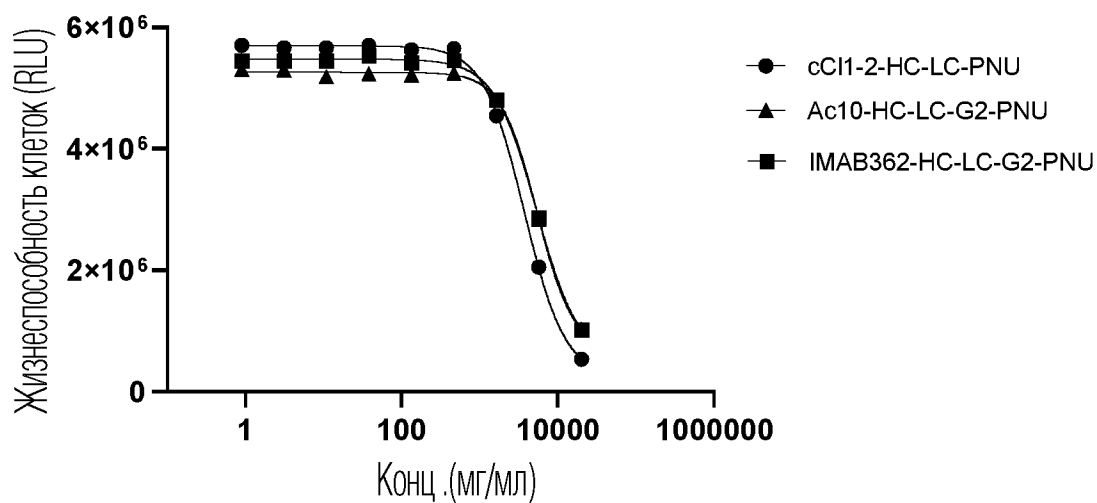
ФИГ. 11С

## HEK293T-CLDN18.1



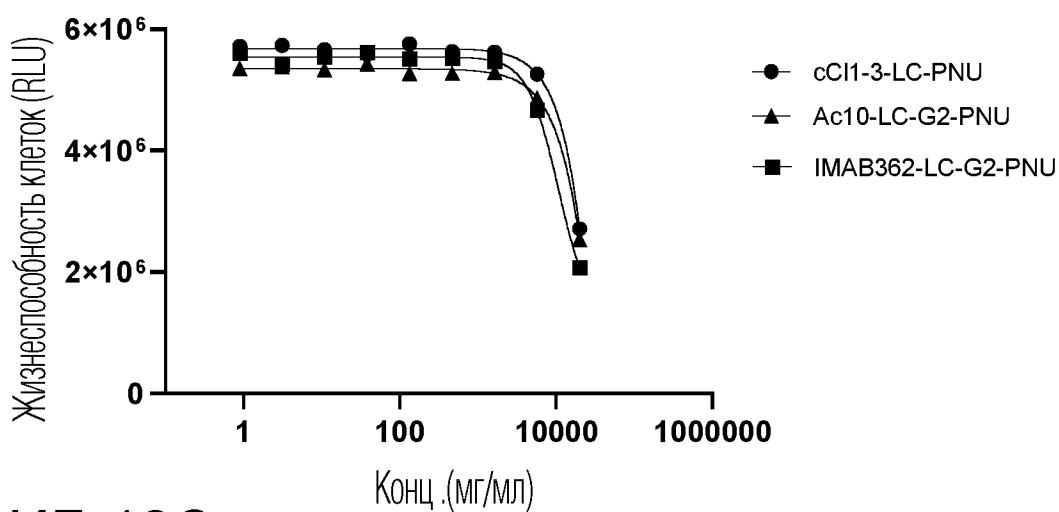
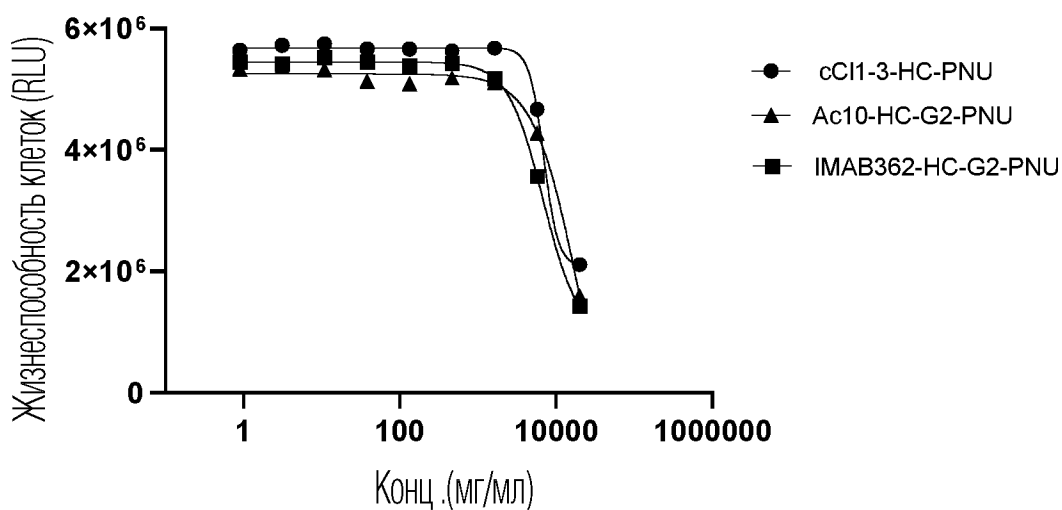
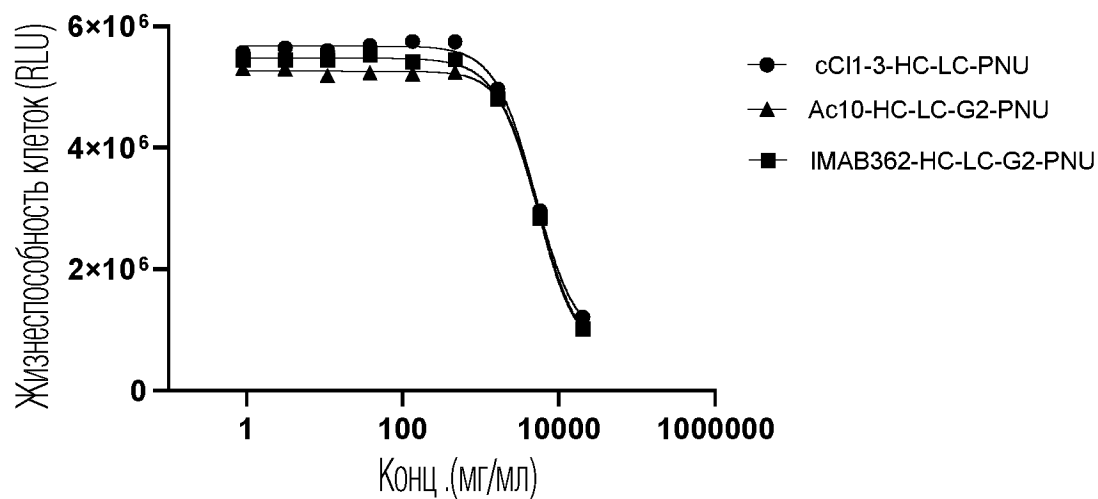
ФИГ. 12А

## HEK293T-CLDN18.1



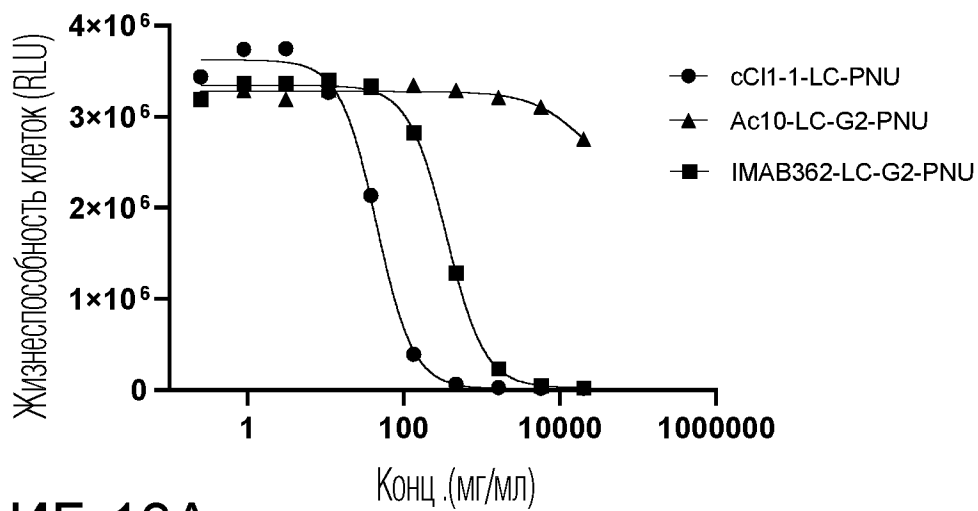
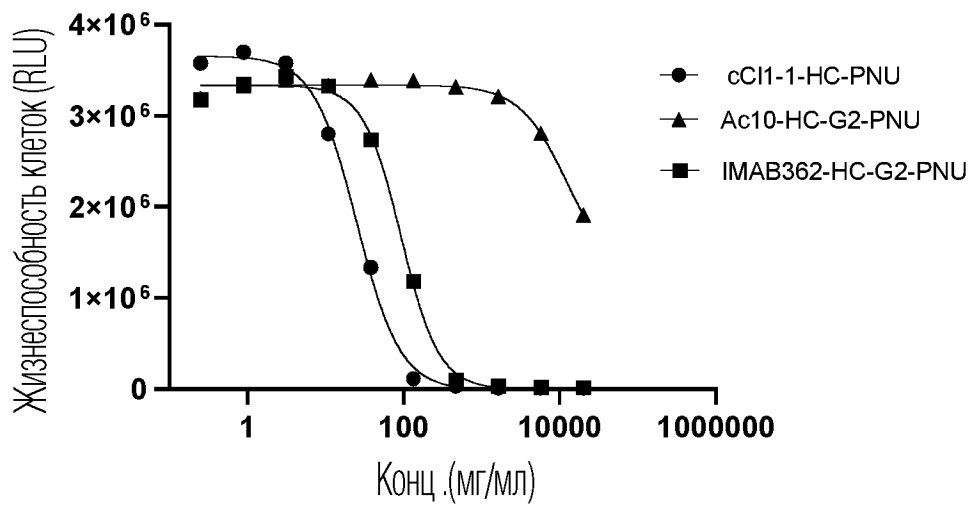
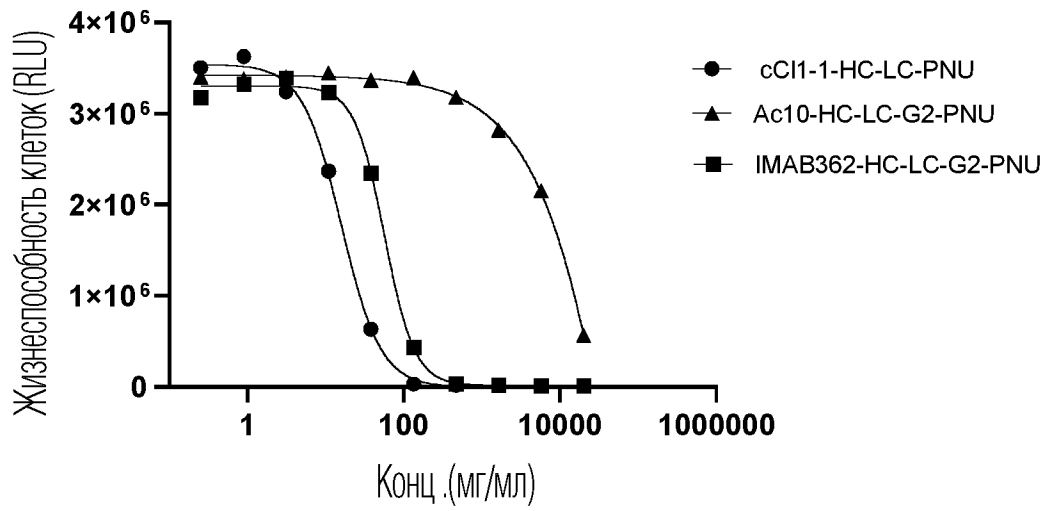
ФИГ. 12В

## HEK293T-CLDN18.1



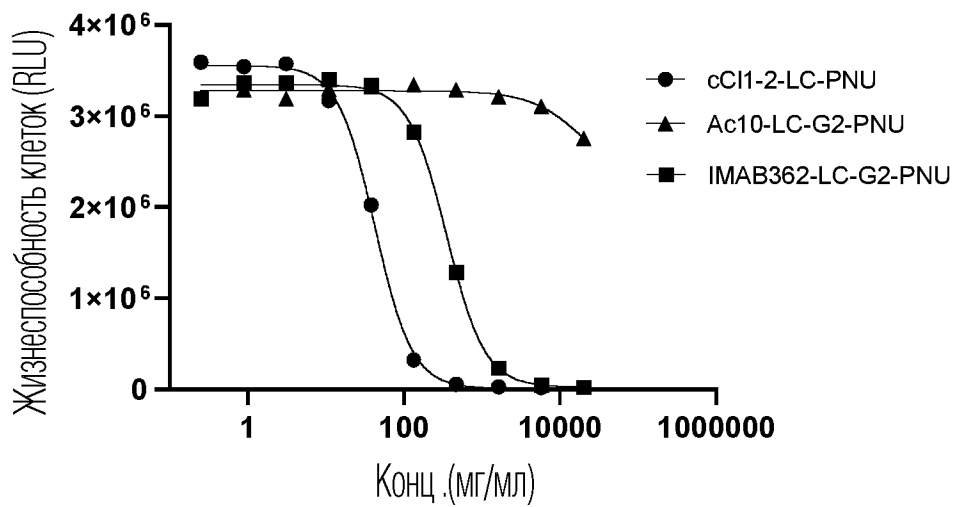
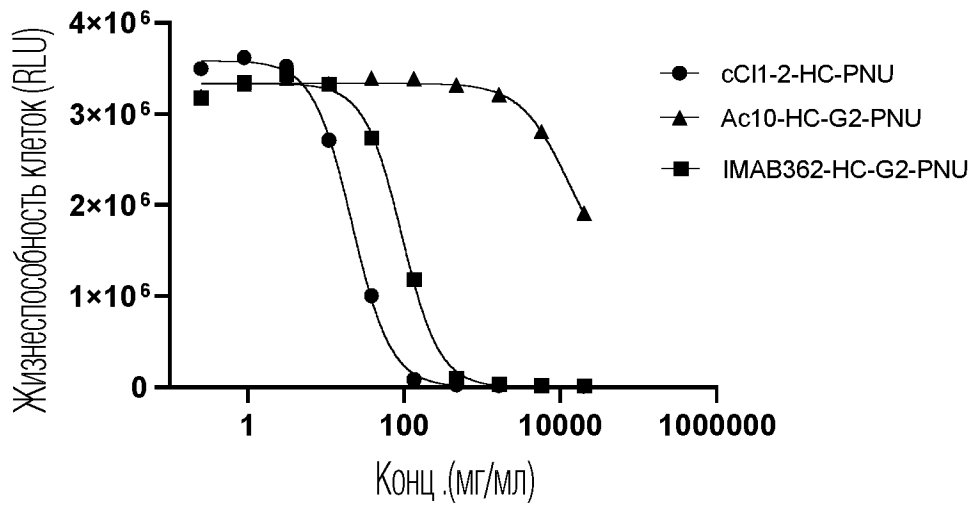
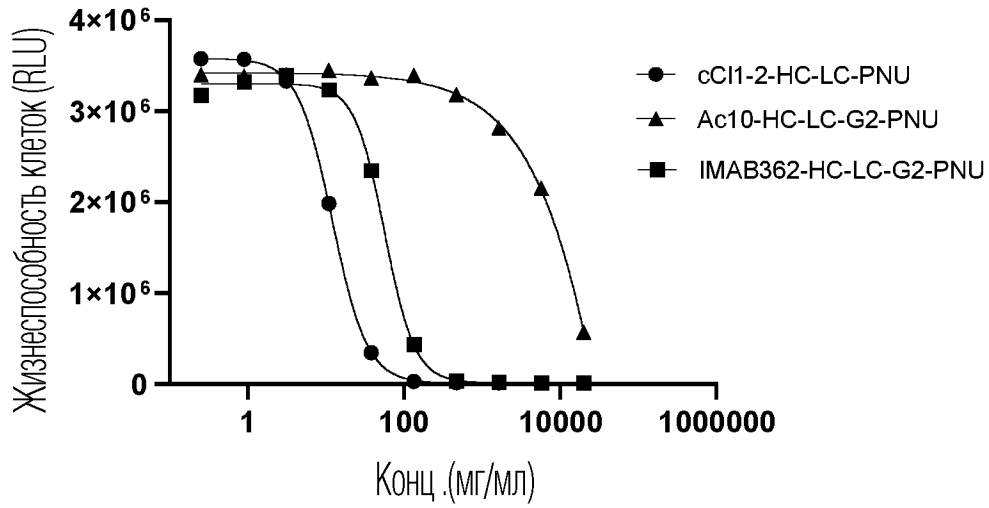
ФИГ. 12С

## ВхPC3-CLDN18.2



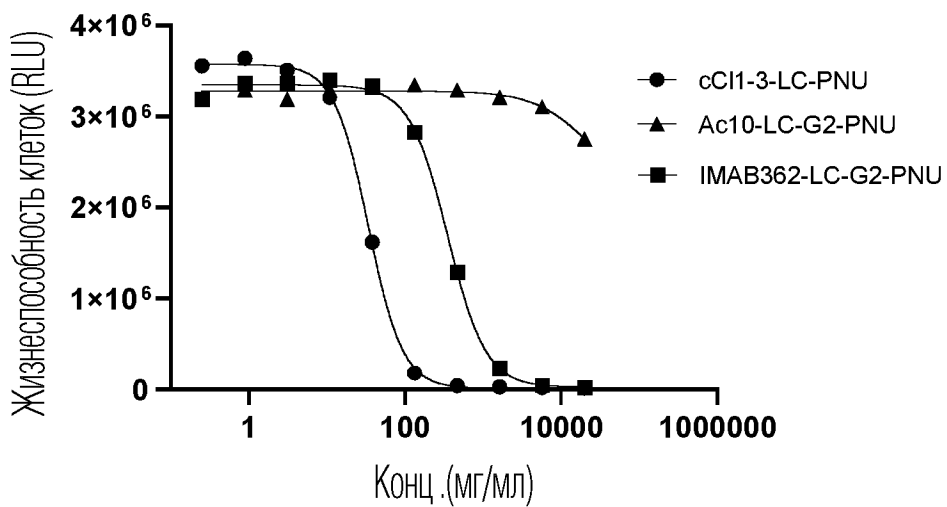
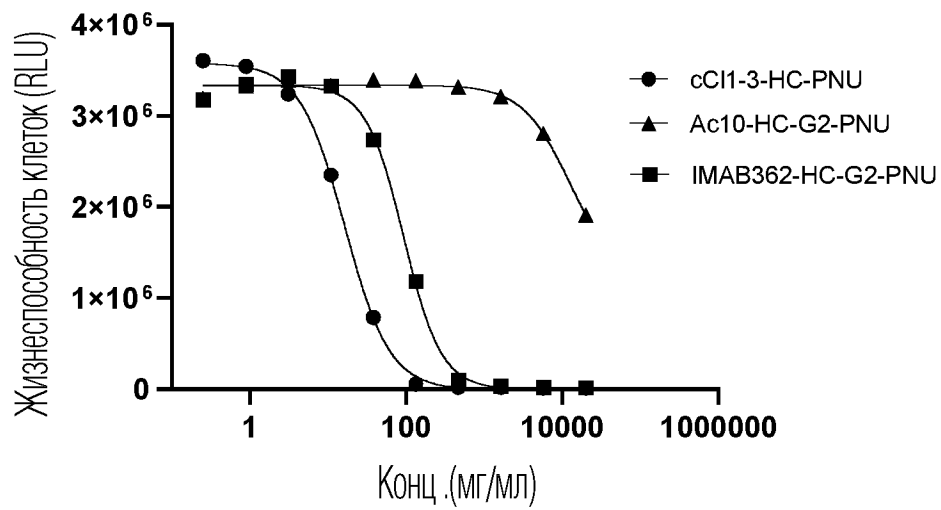
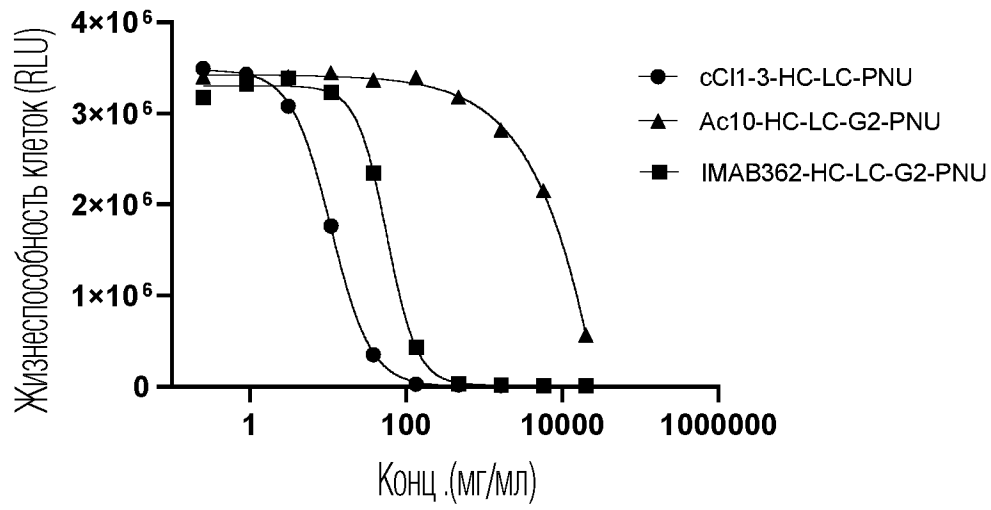
ФИГ. 13А

## BxPC3-CLDN18.2



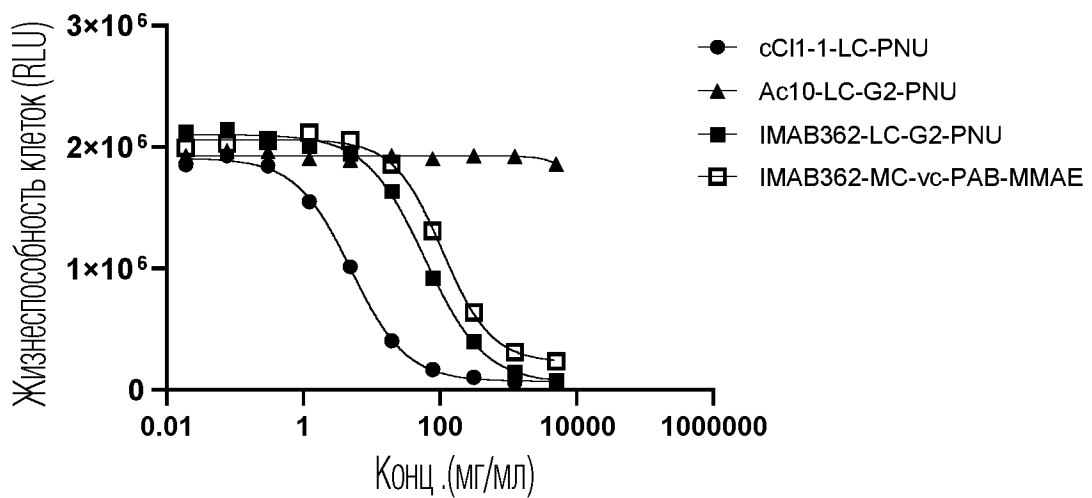
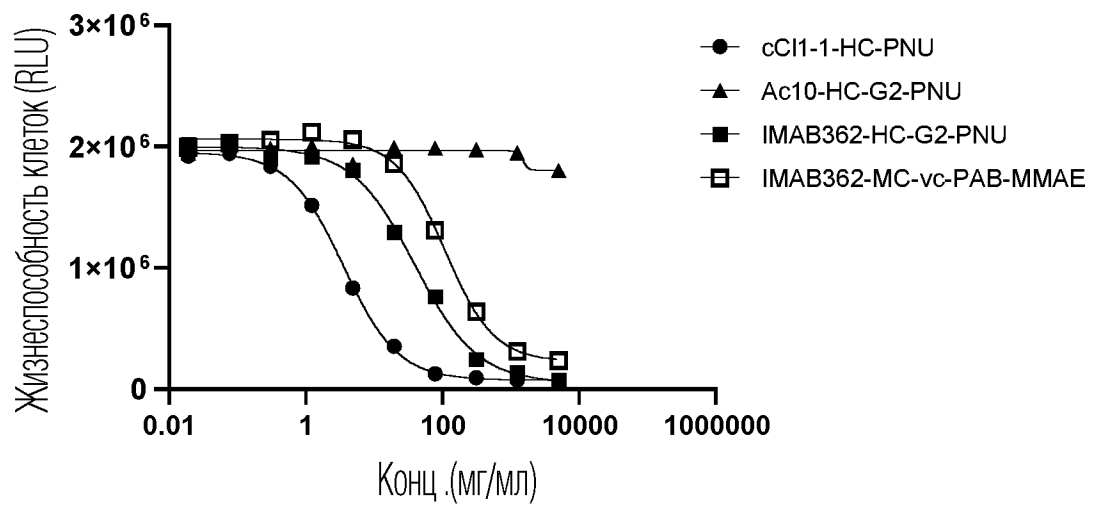
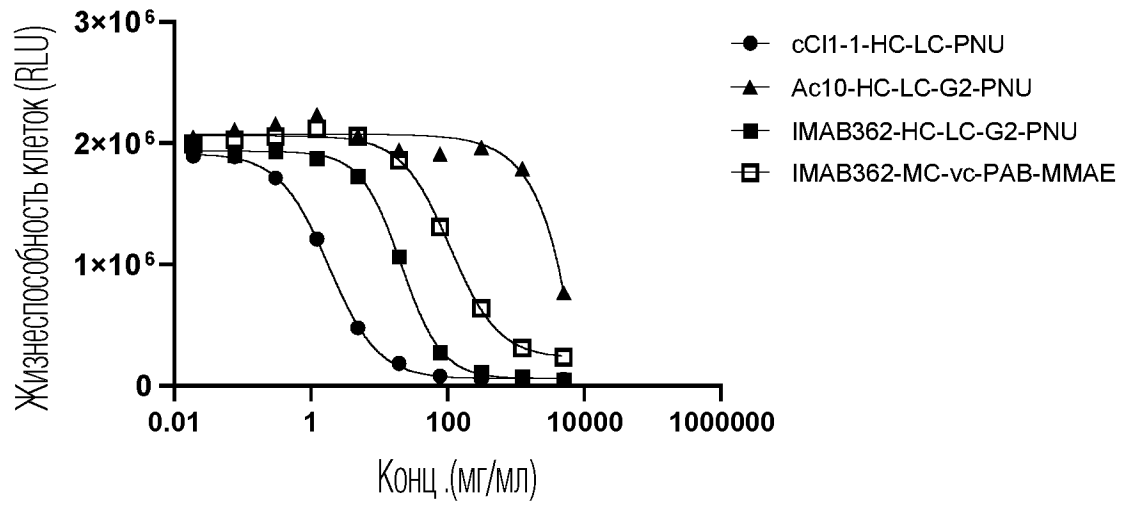
ФИГ. 13В

## BxPC3-CLDN18.2



ФИГ. 13С

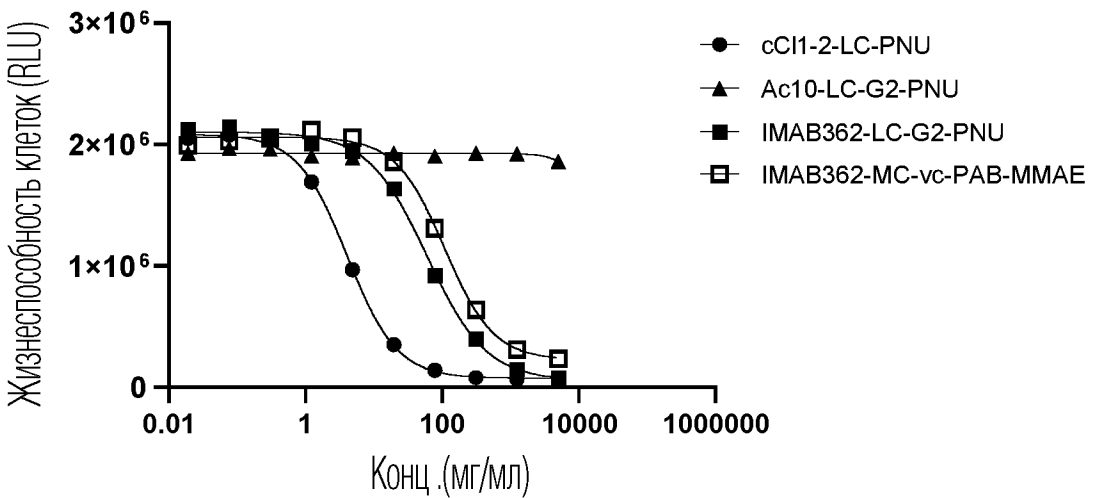
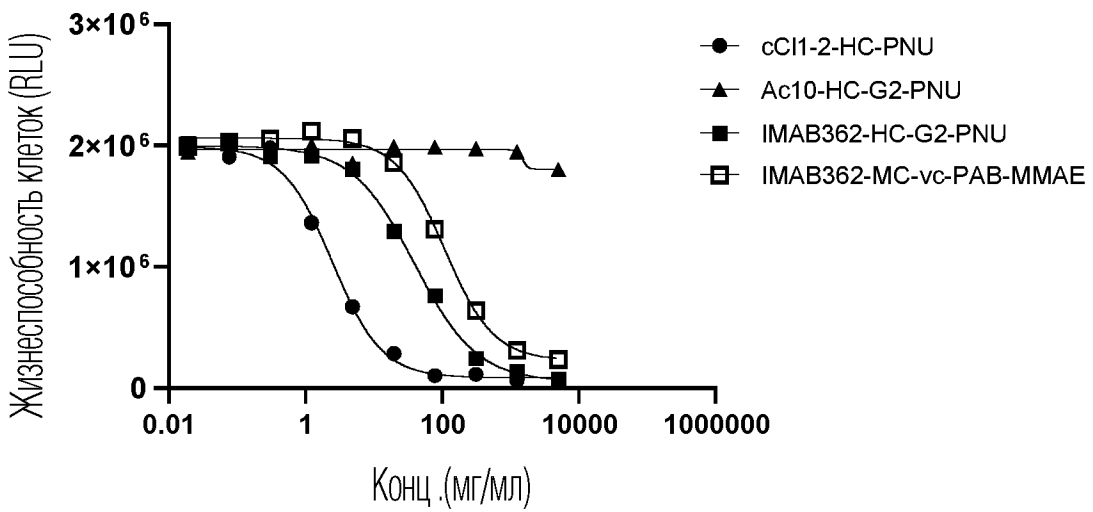
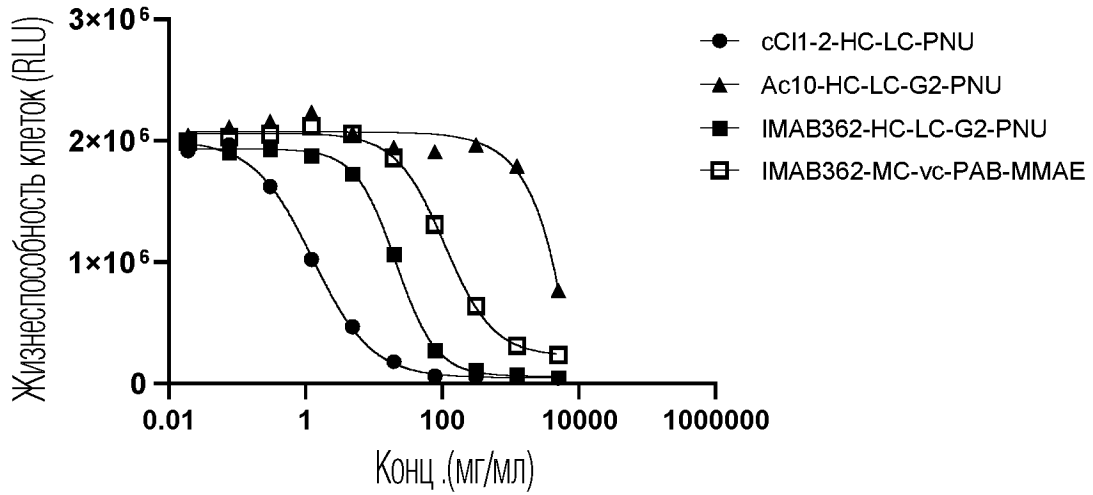
## A549-CLDN18.2



ФИГ. 14А

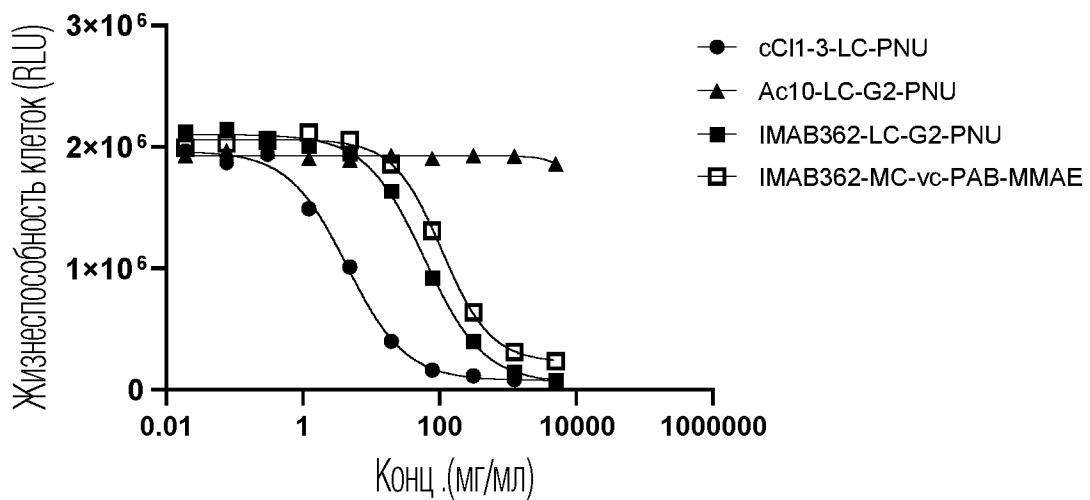
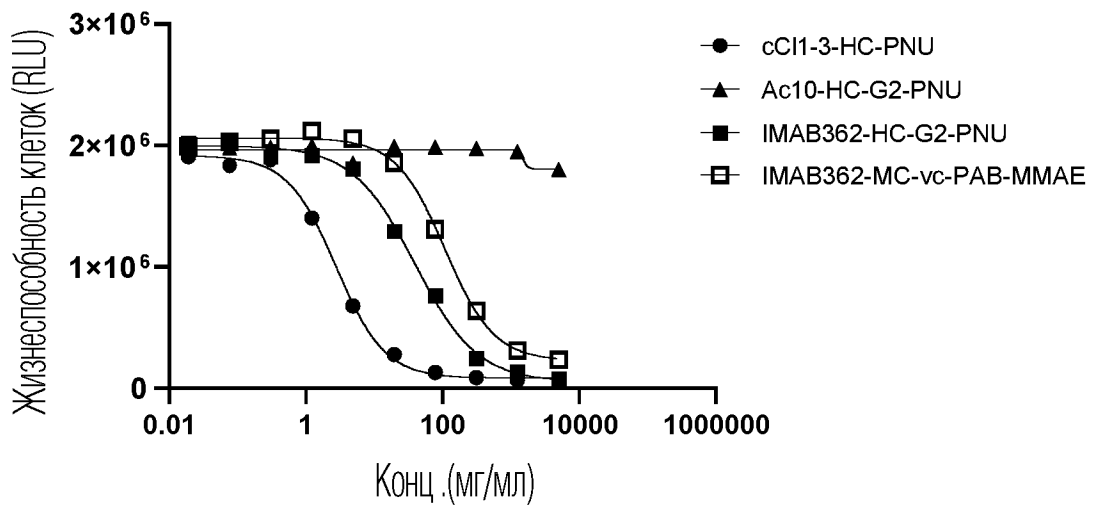
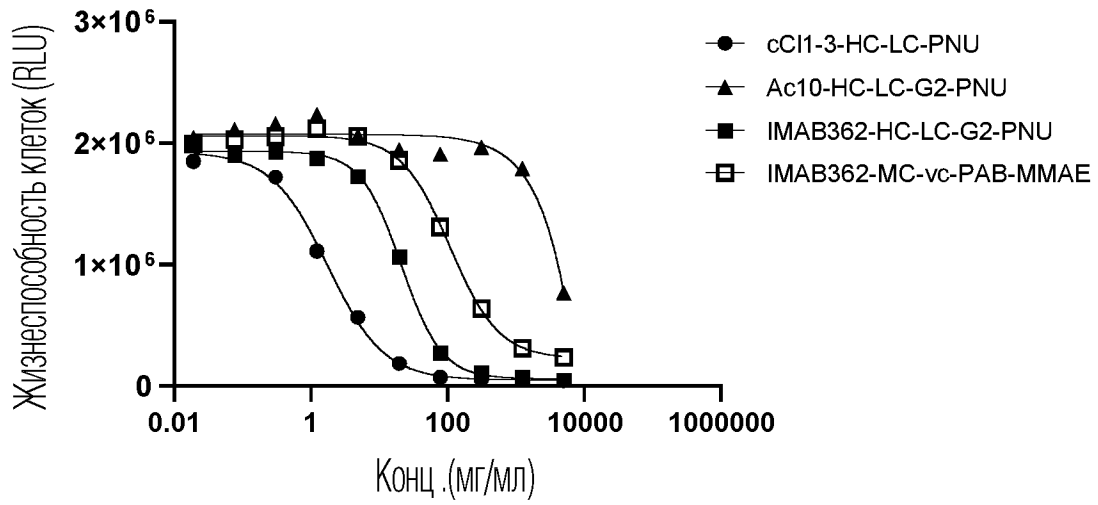


## A549-CLDN18.2



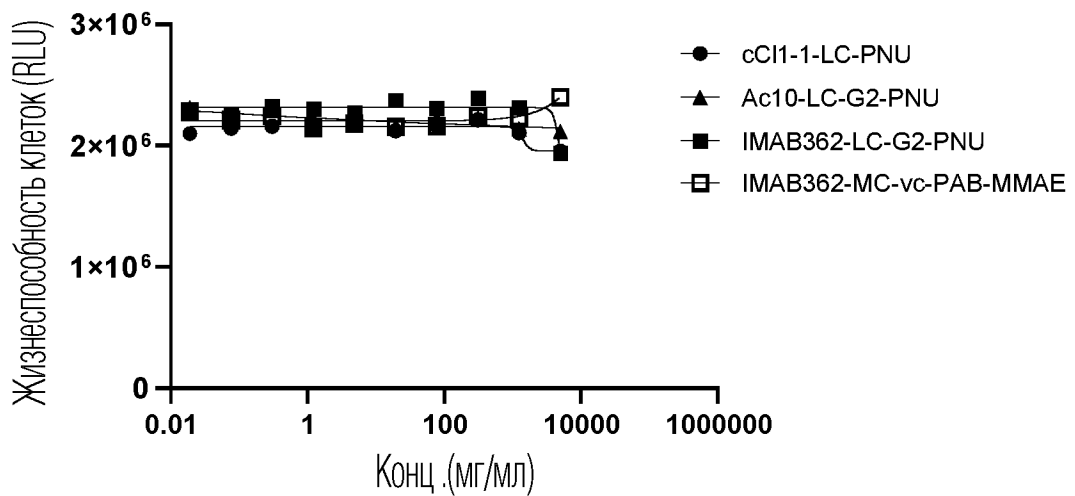
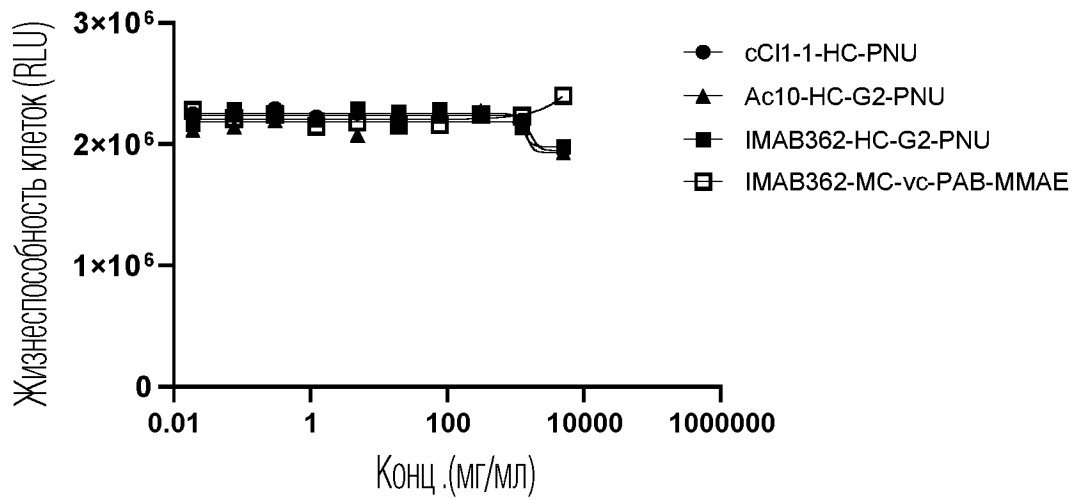
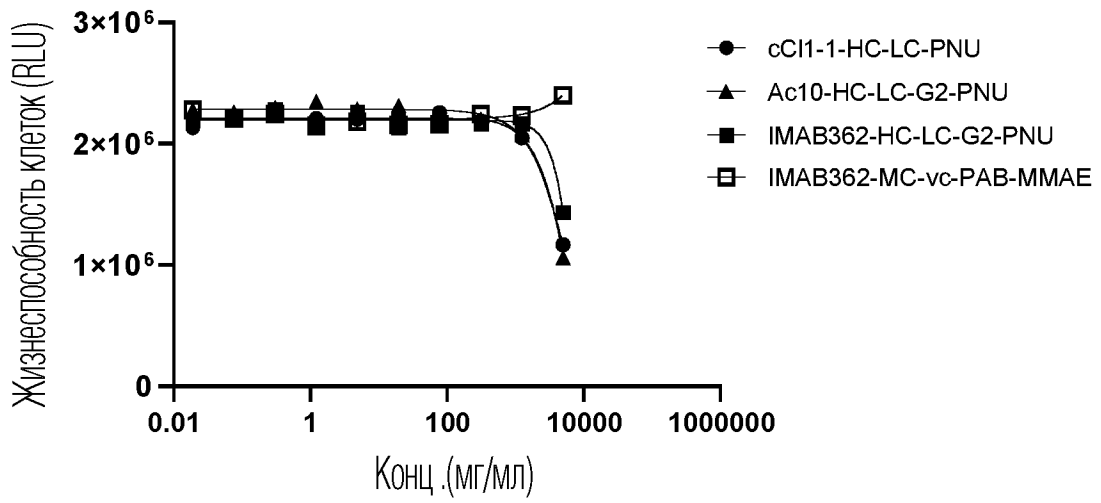
ФИГ. 14В

## A549-CLDN18.2



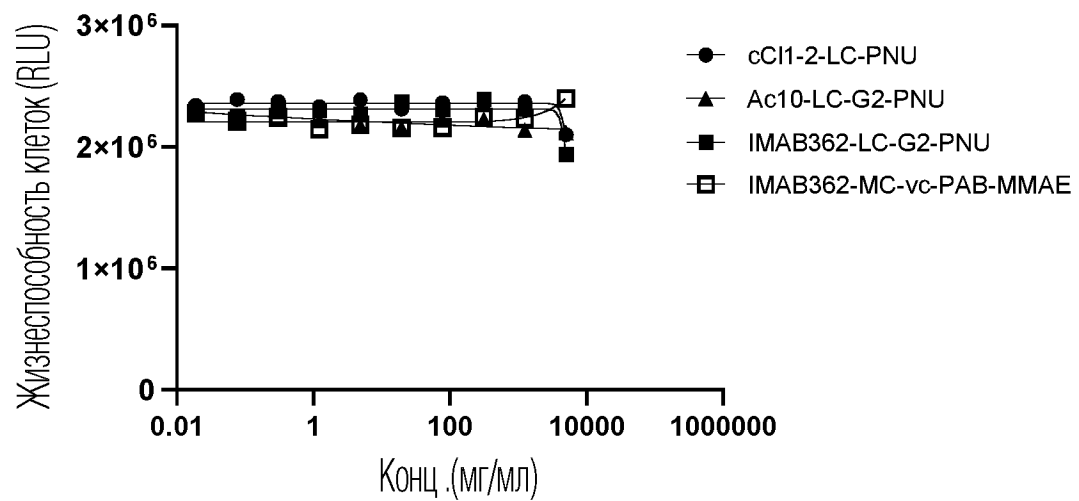
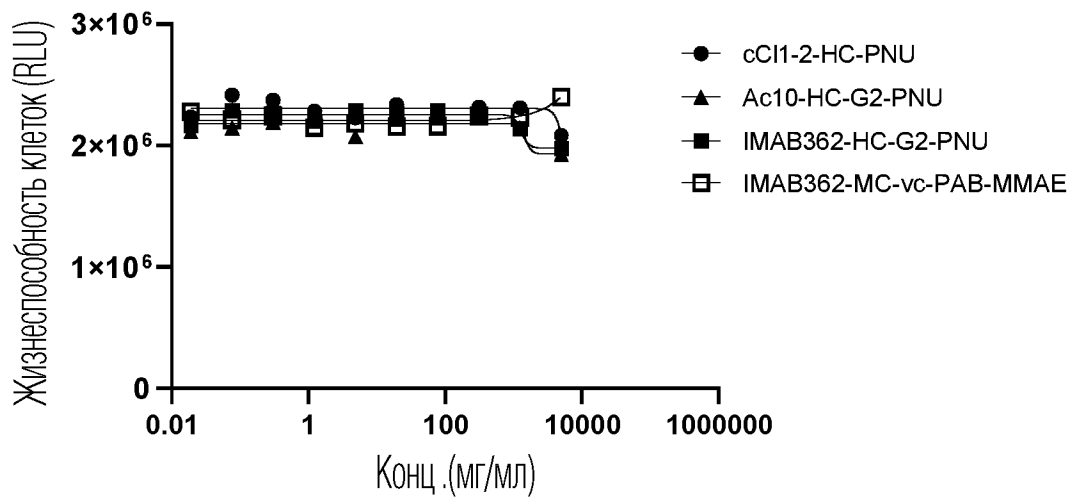
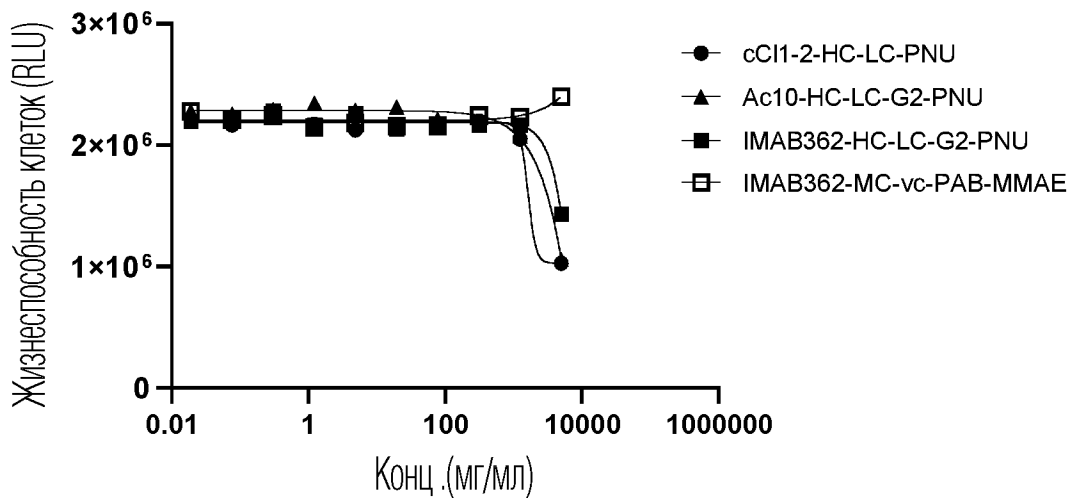
ФИГ. 14С

## A549-CLDN18.1



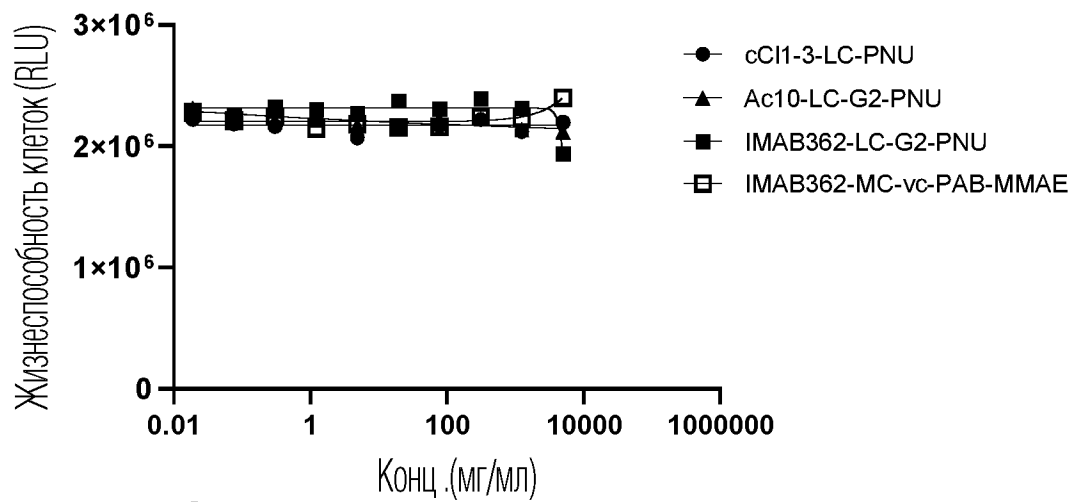
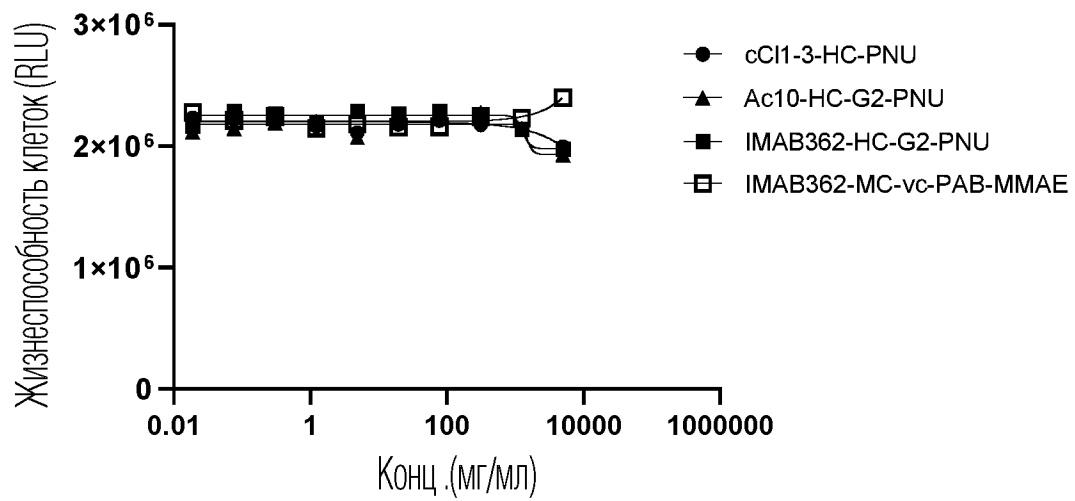
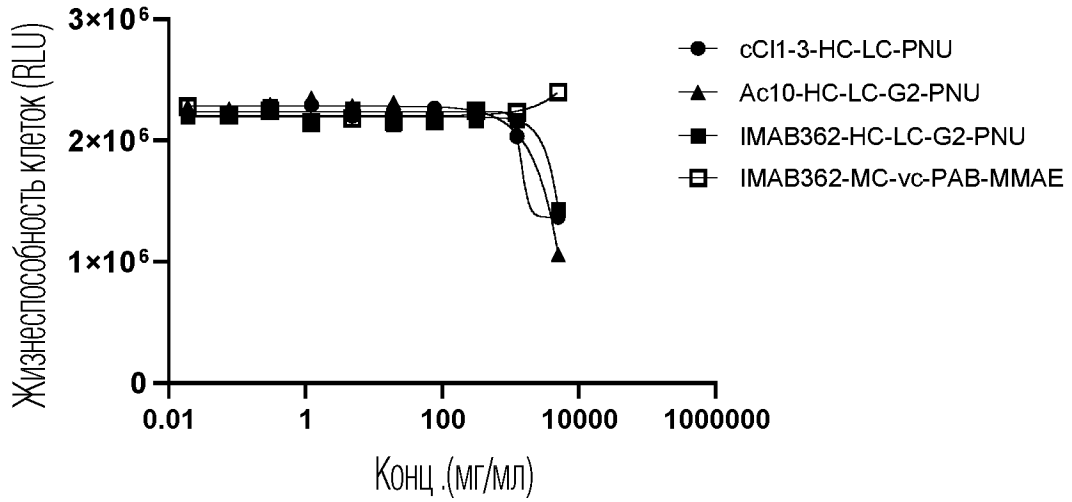
ФИГ. 15А

## A549-CLDN18.1



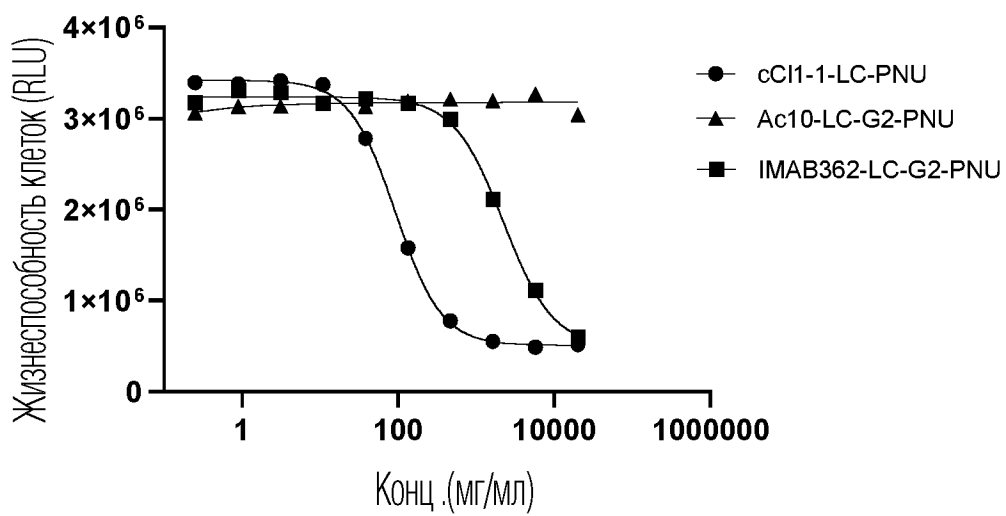
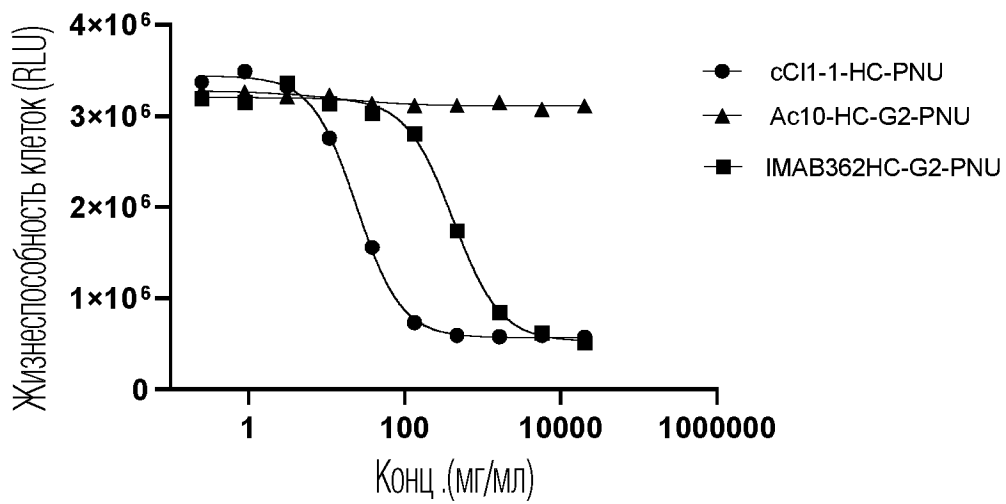
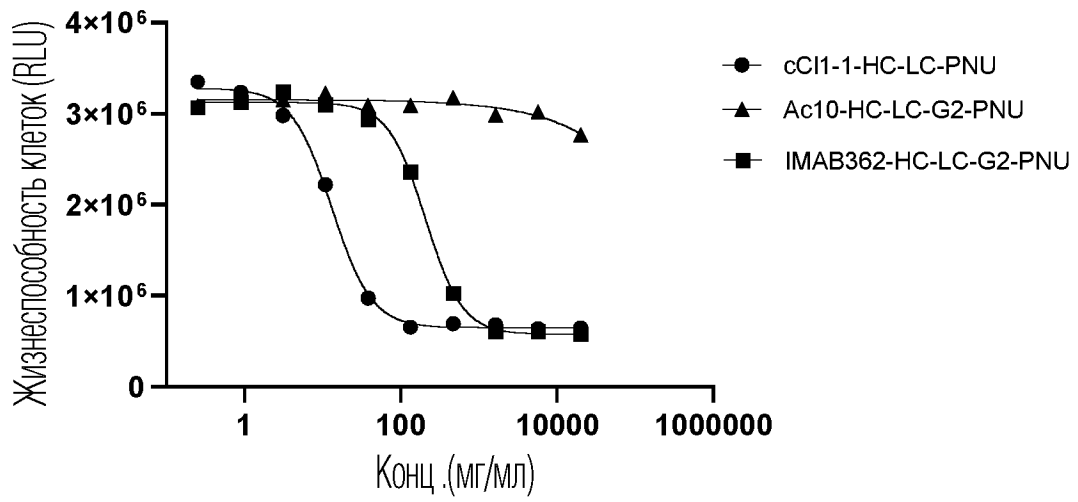
ФИГ. 15В

## A549-CLDN18.1



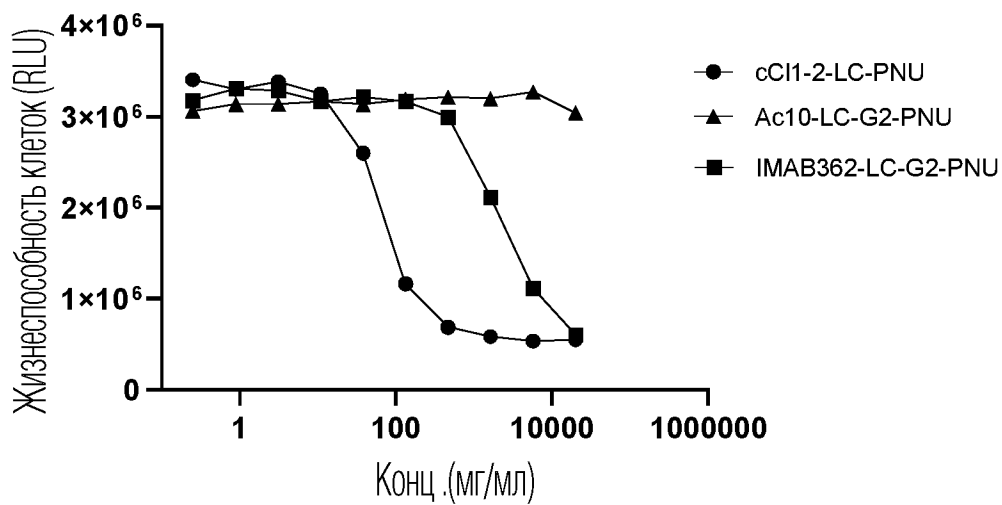
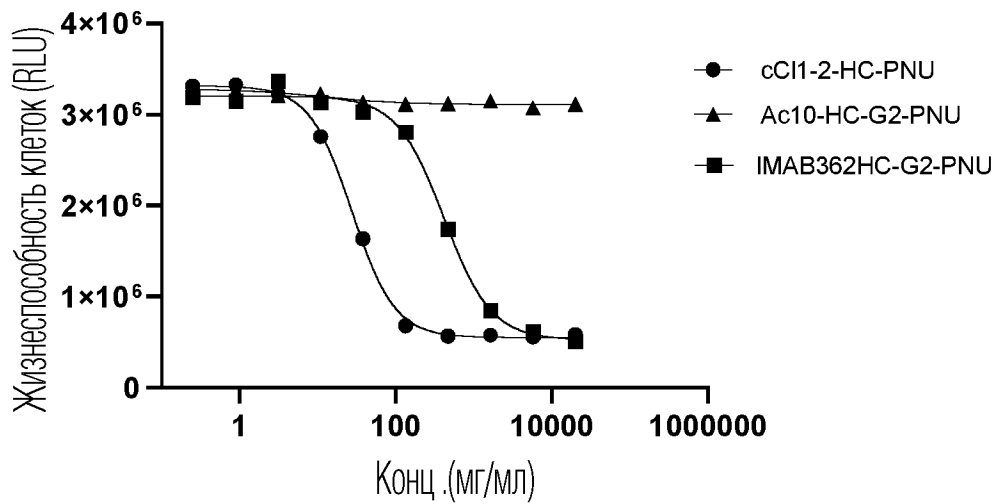
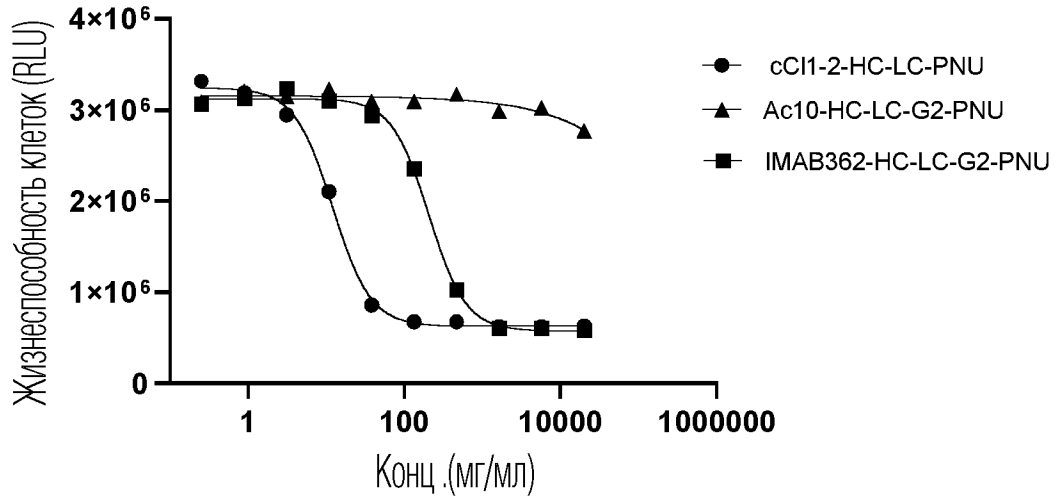
ФИГ. 15С

## PA-TU-8988S-High



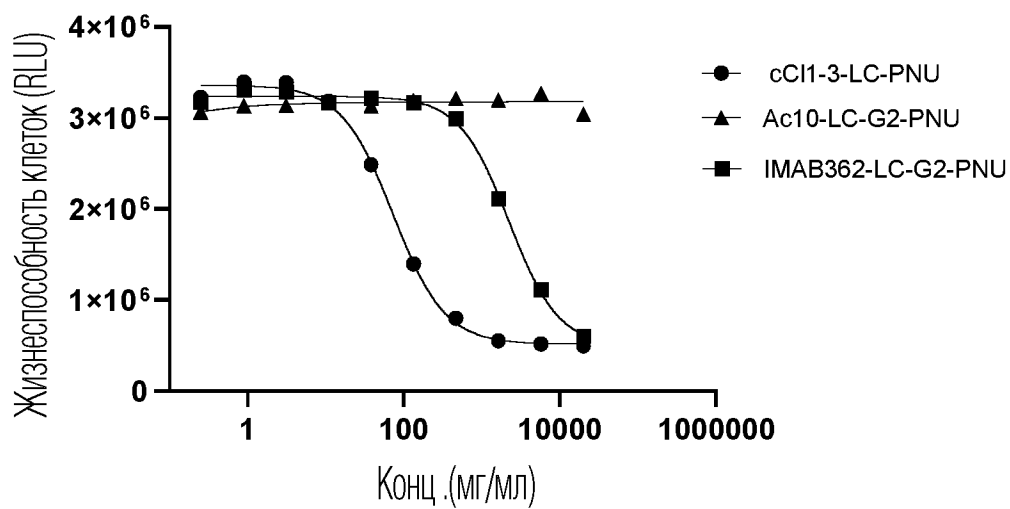
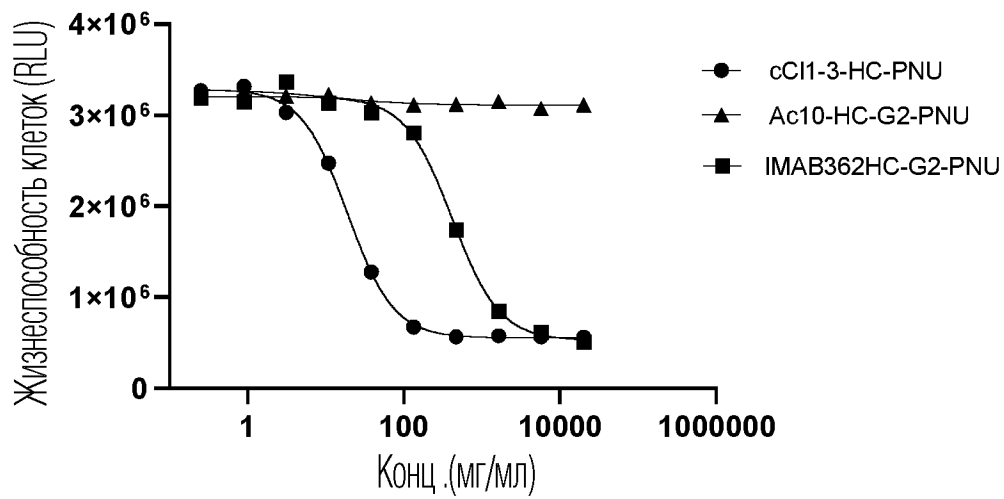
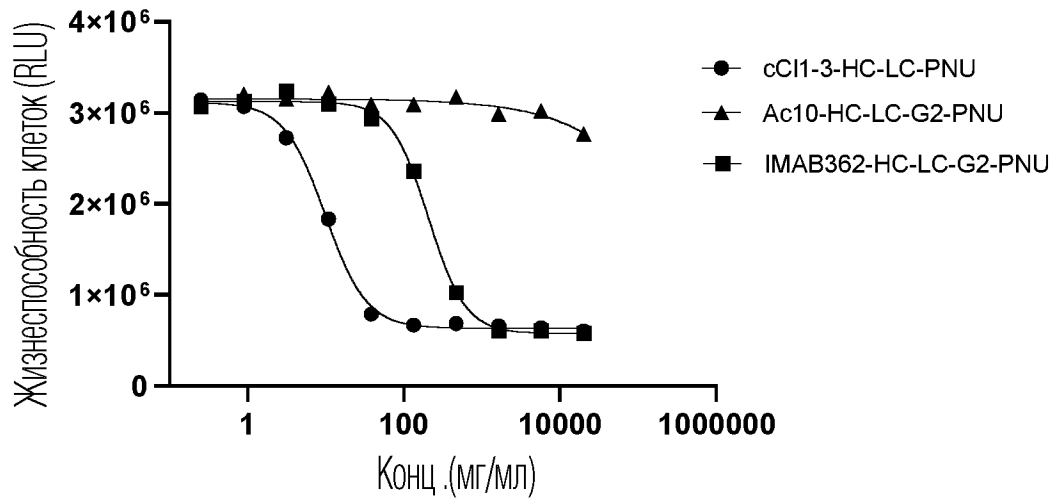
ФИГ. 16А

## PA-TU-8988S-High



ФИГ. 16В

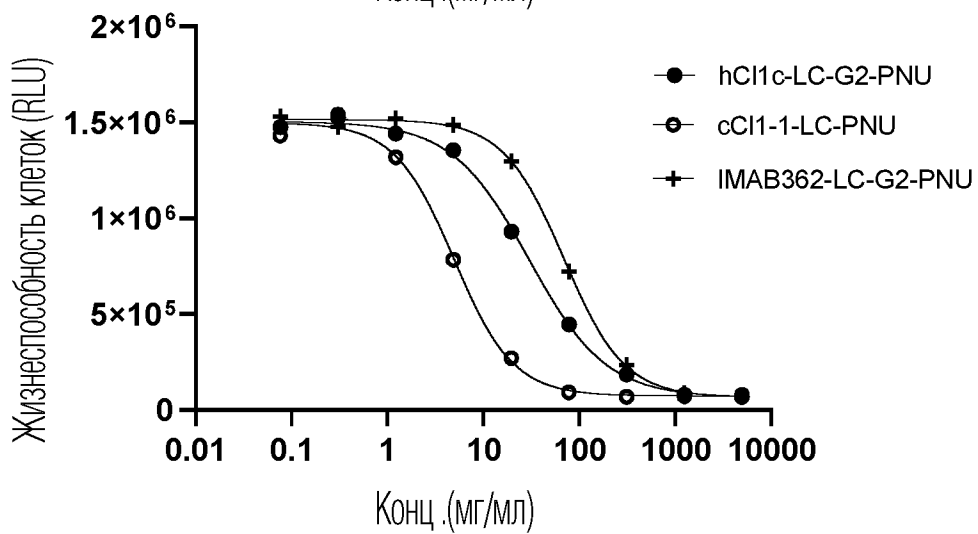
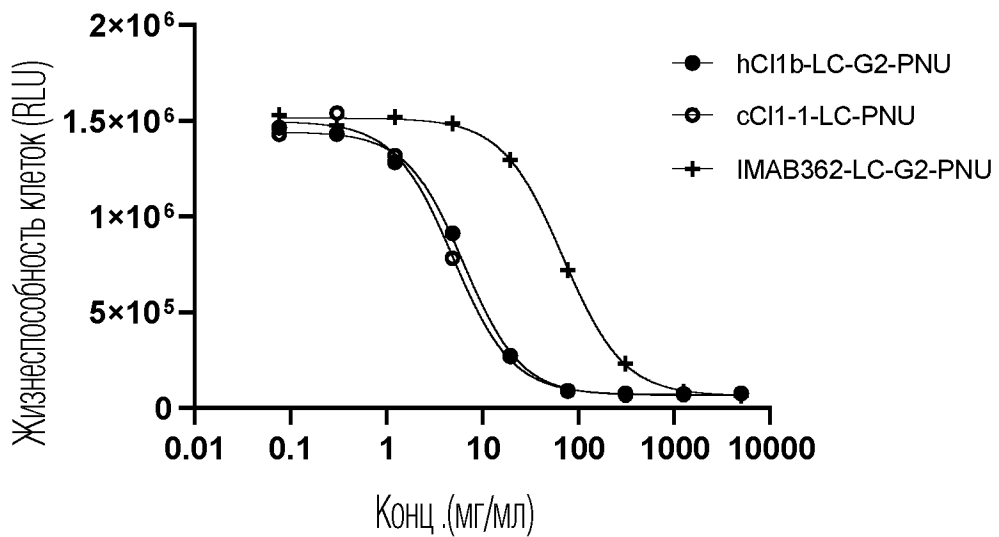
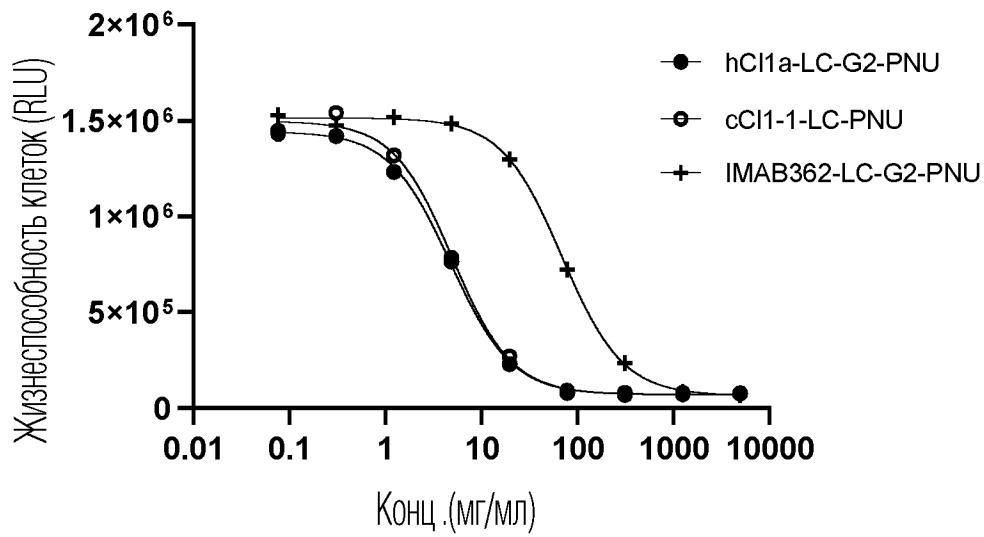
## PA-TU-8988S-High



ФИГ. 16С

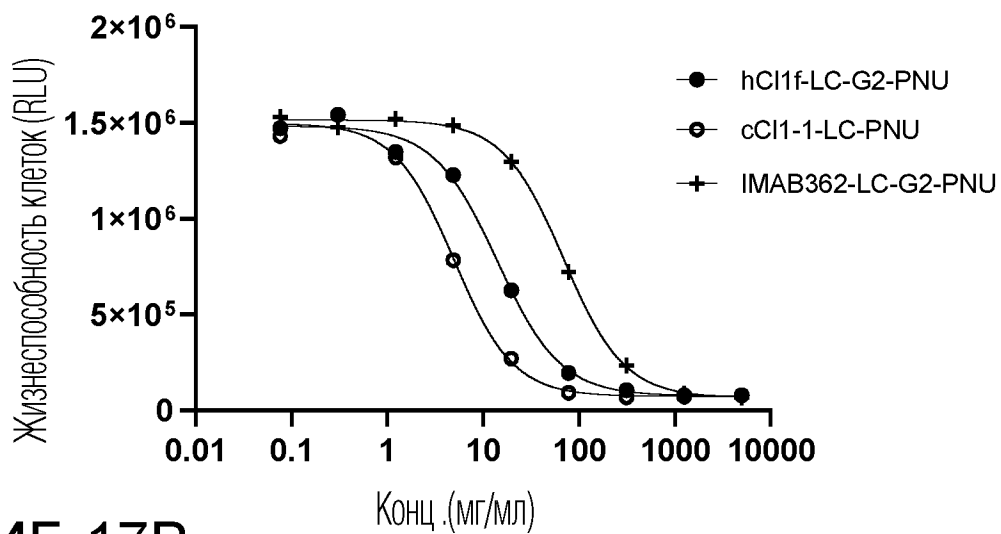
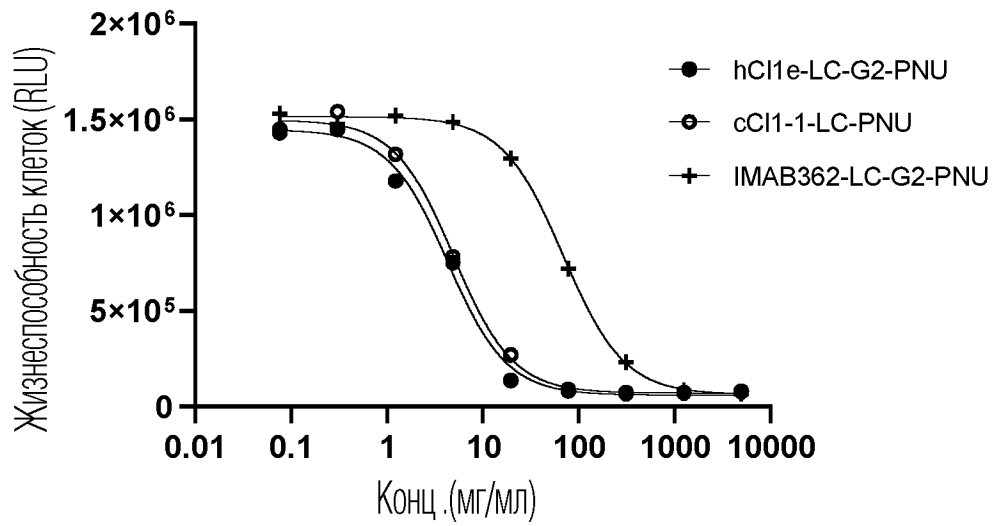
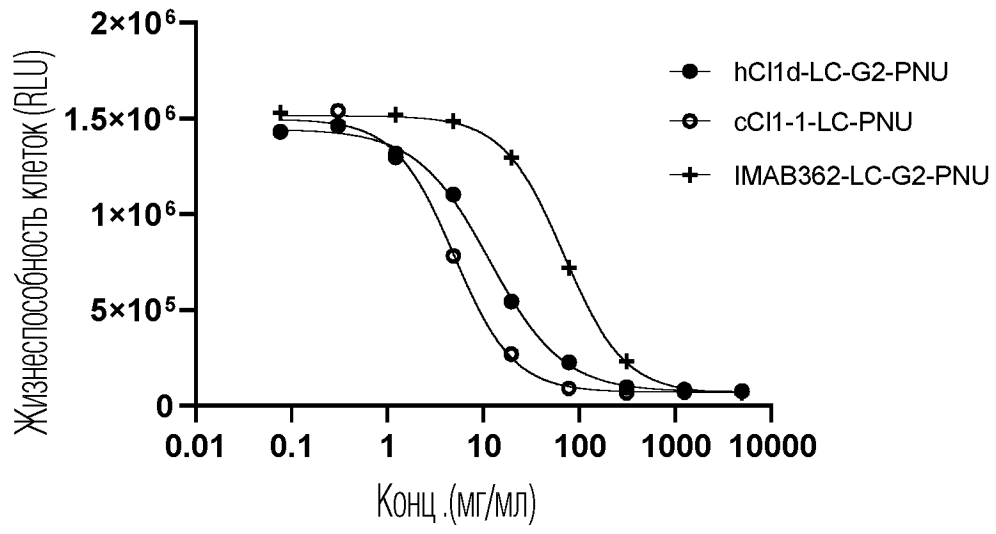


A549-CLDN18.2



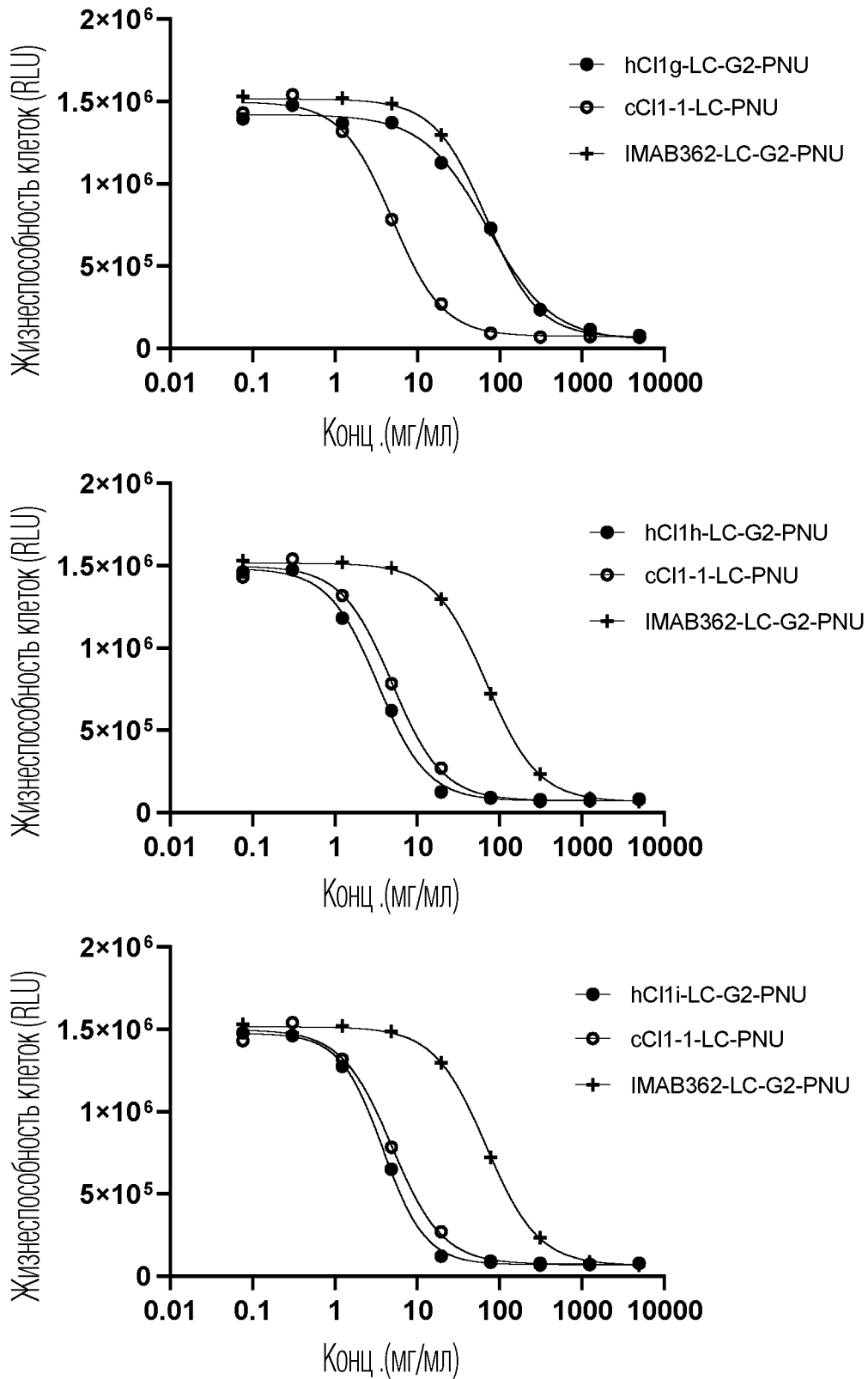
ФИГ. 17А

## A549-CLDN18.2



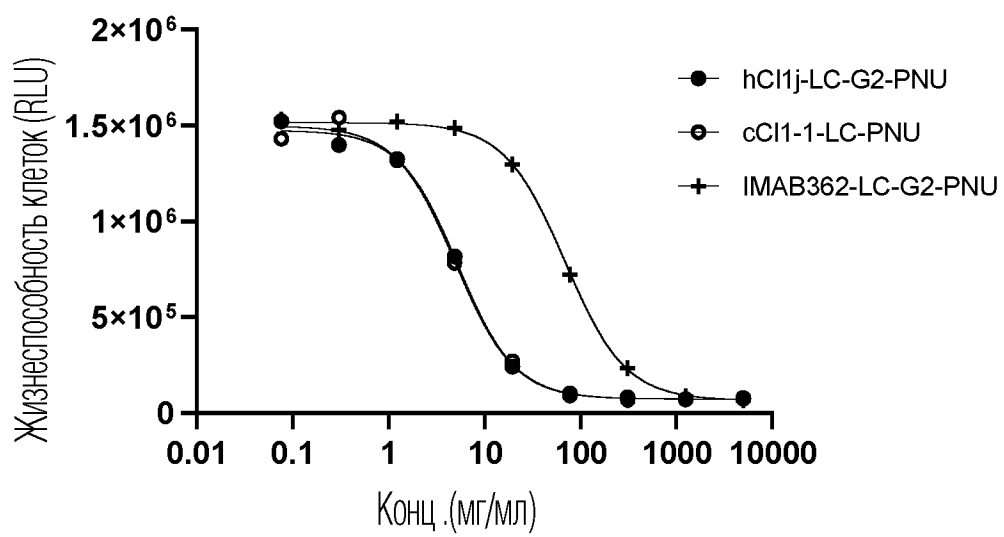
ФИГ. 17В

## A549-CLDN18.2



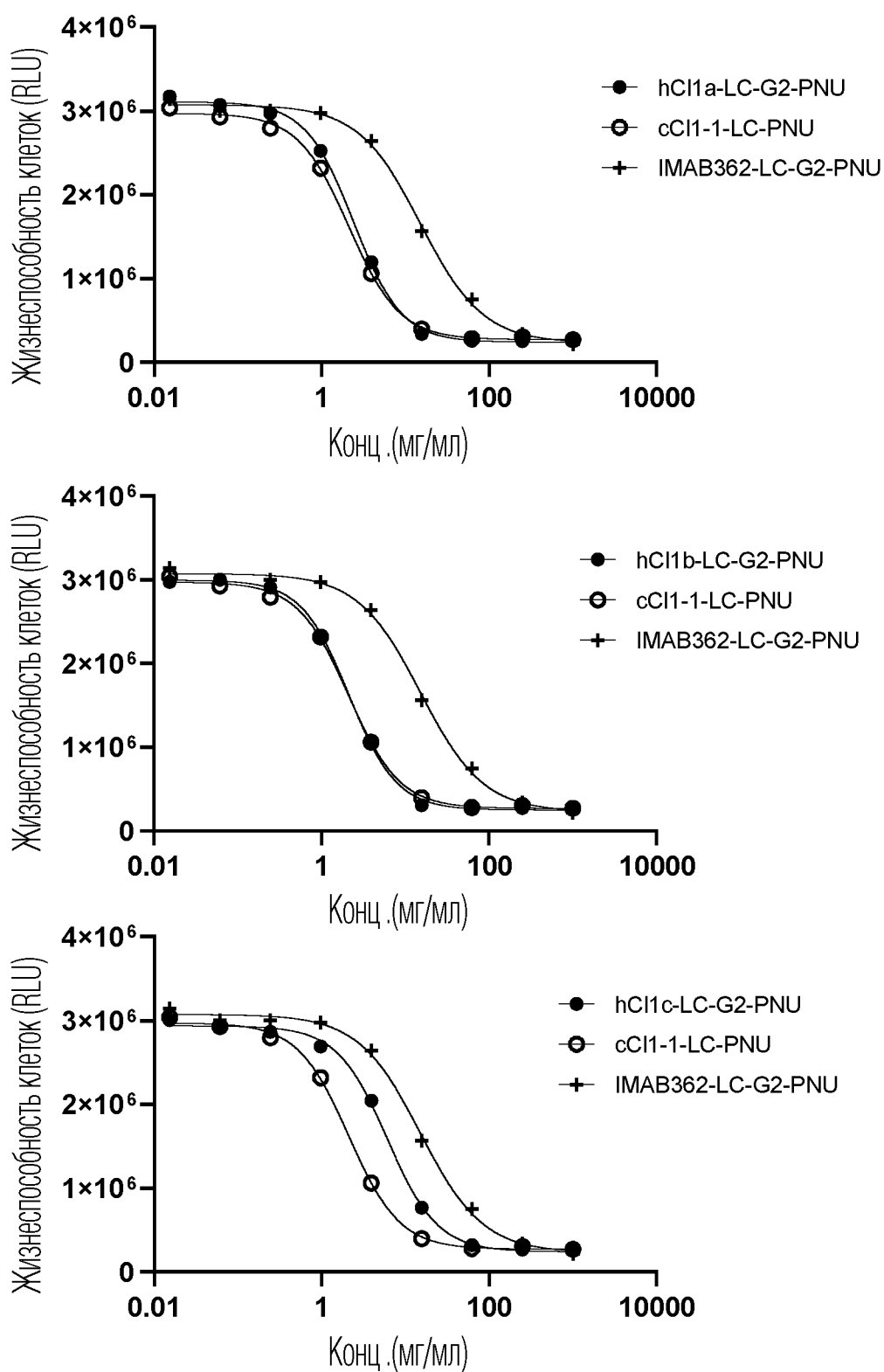
ФИГ. 17С

A549-CLDN18.2



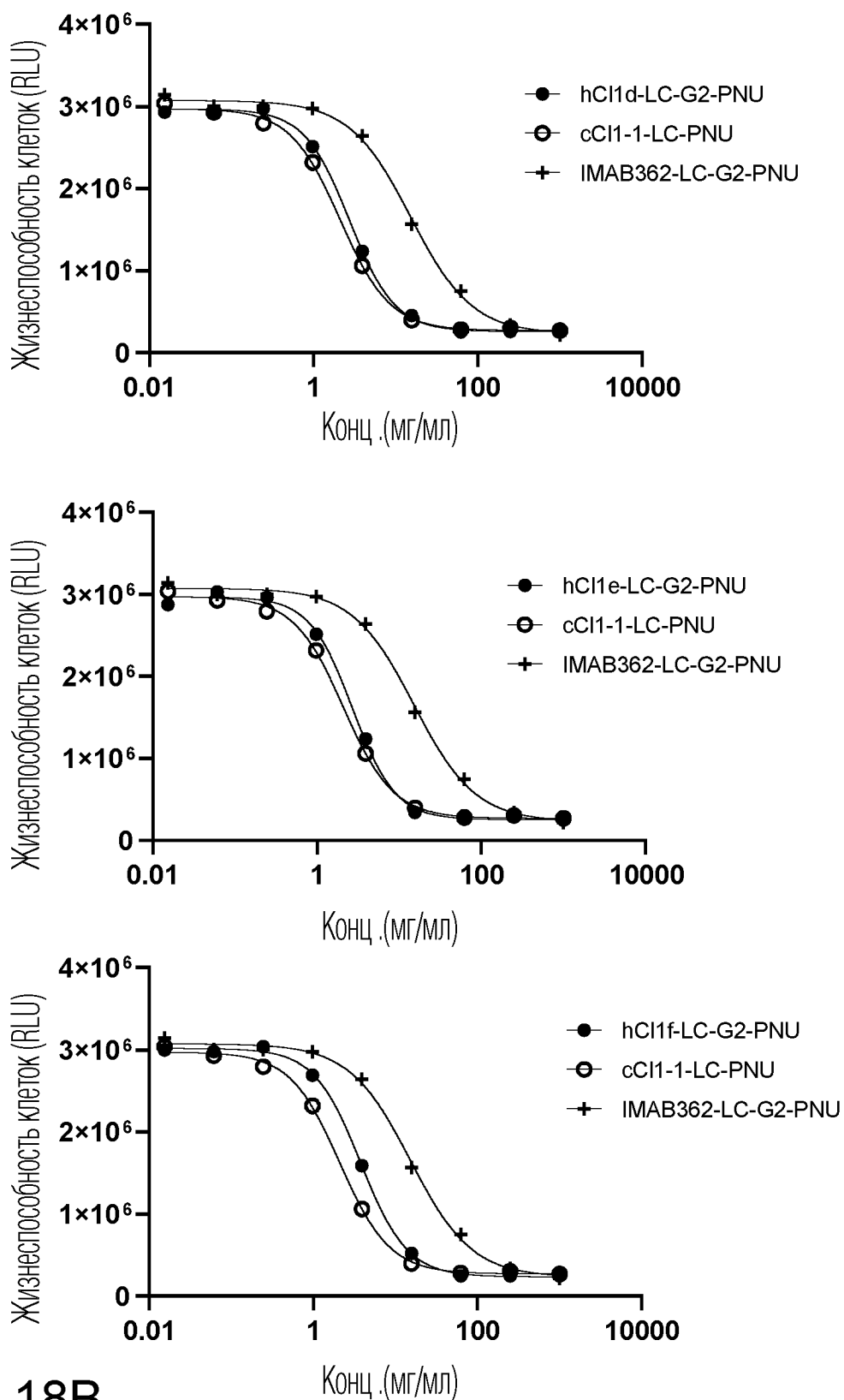
ФИГ. 17D

## HEK293T-CLDN18.2



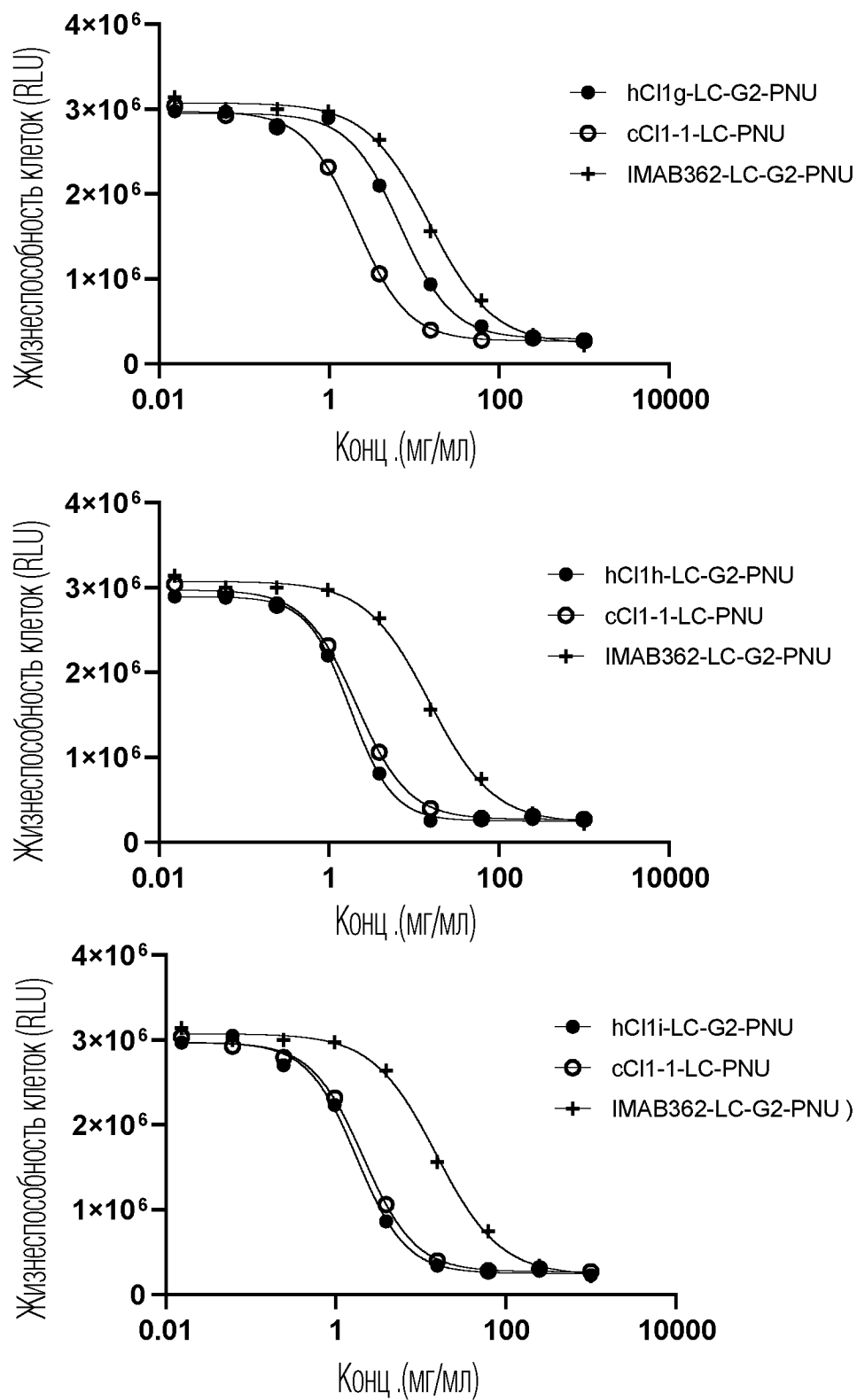
ФИГ. 18А

## HEK293T-CLDN18.2



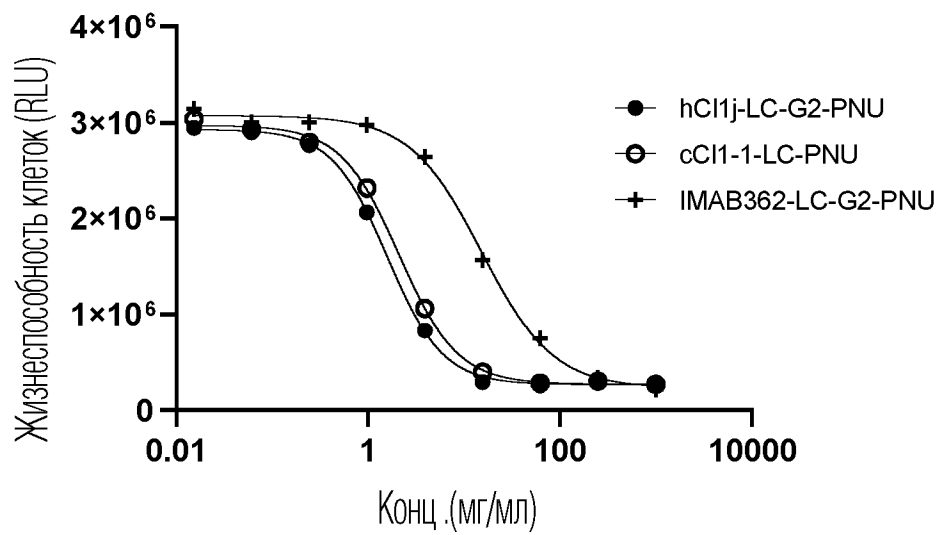
ФИГ. 18В

## HEK293T-CLDN18.2



ФИГ. 18С

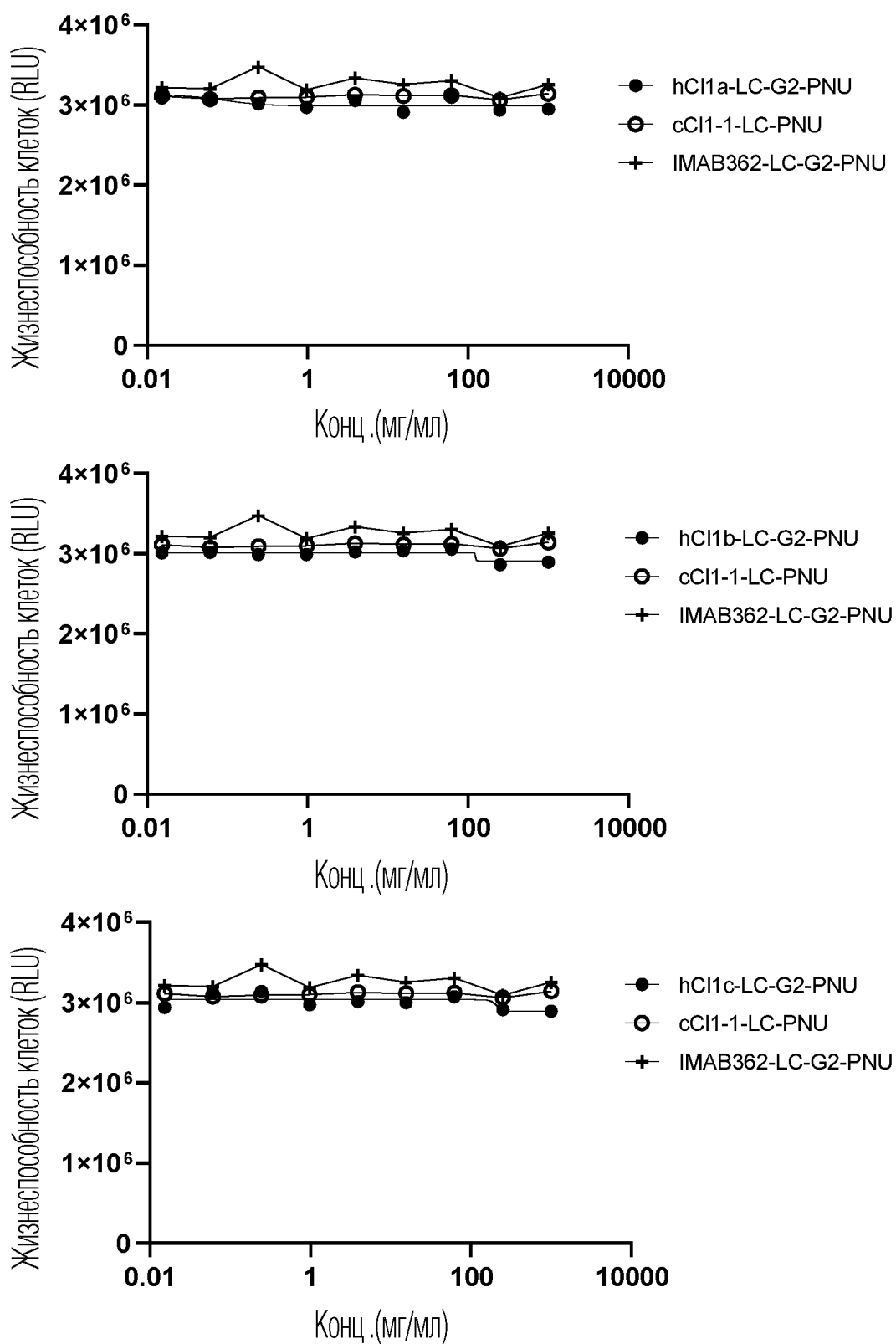
## HEK293T-CLDN18.2



ФИГ. 18D

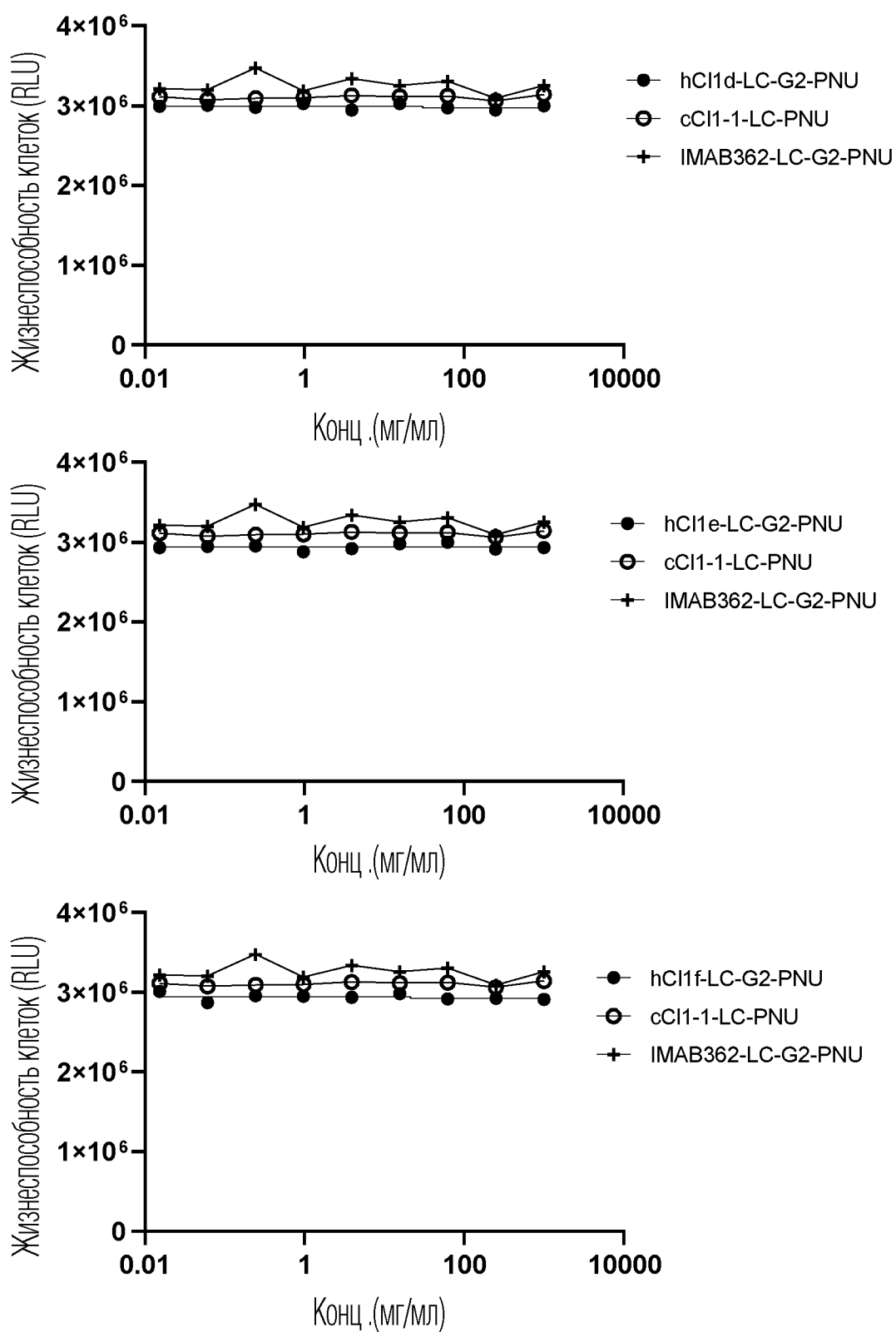


## HEK293T-CLDN18.1



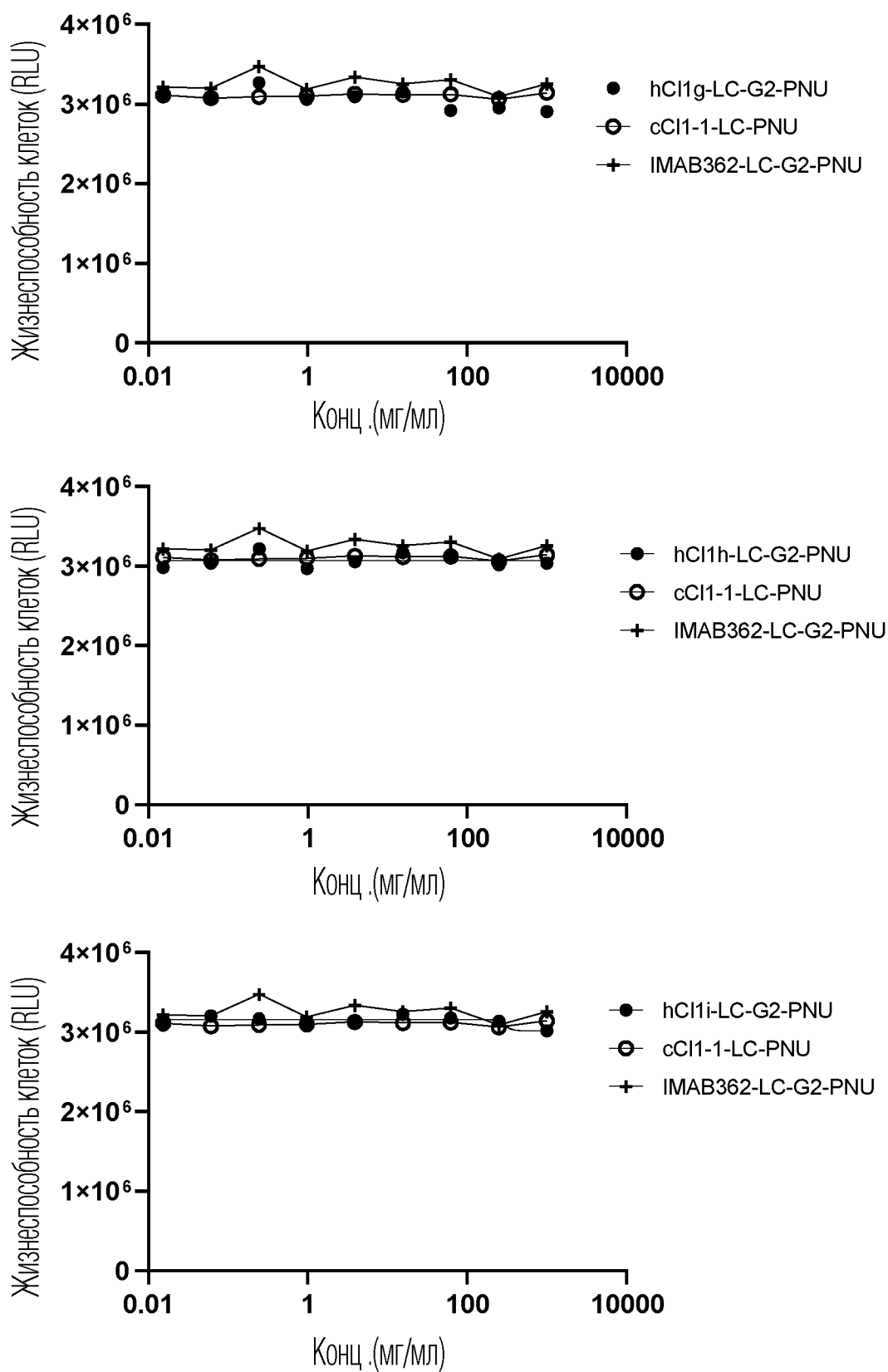
ФИГ. 19А

## HEK293T-CLDN18.1



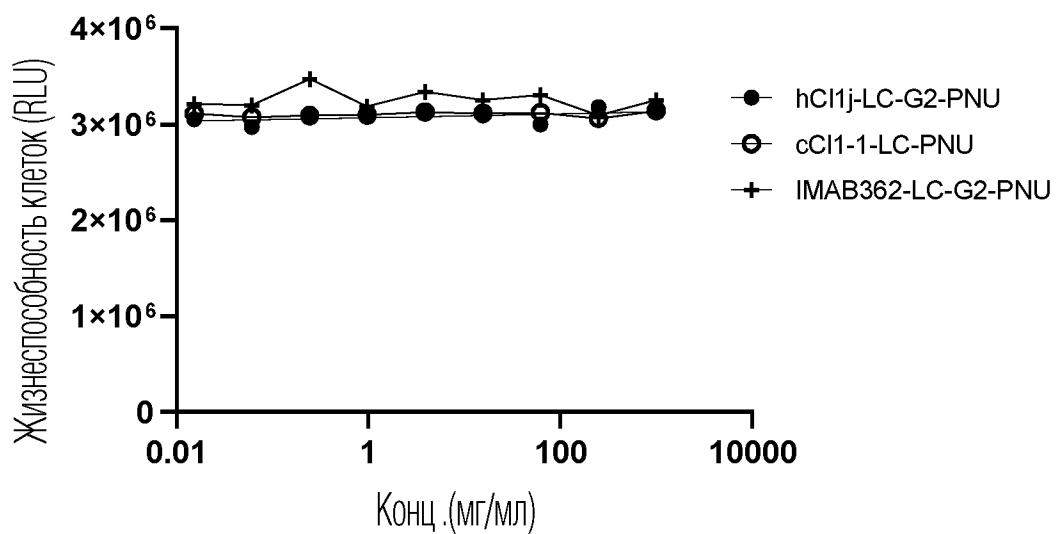
ФИГ. 19В

## HEK293T-CLDN18.1



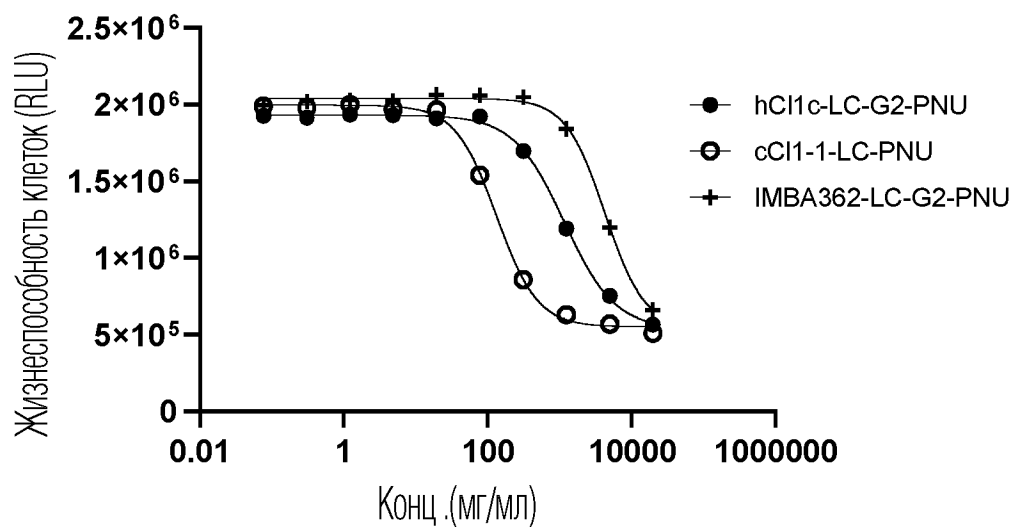
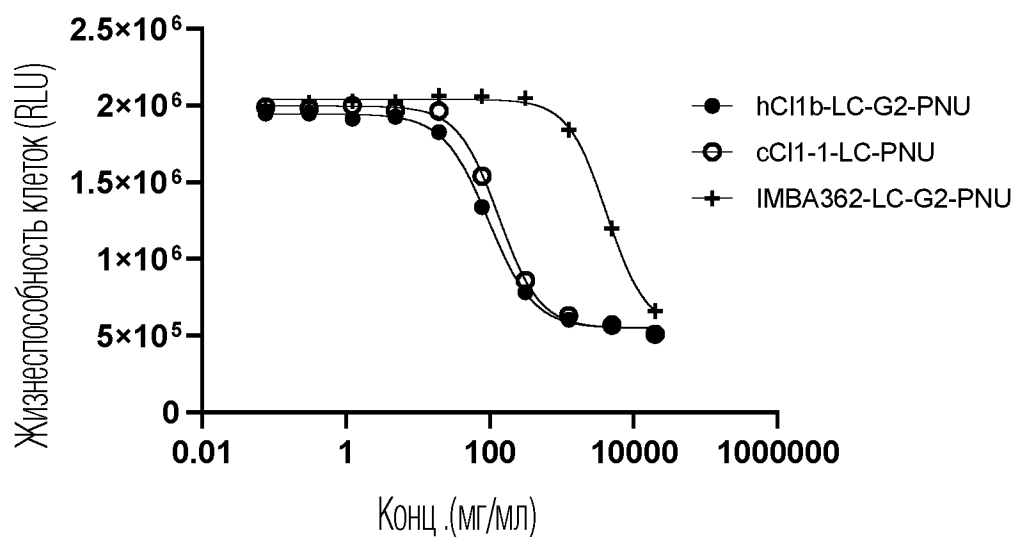
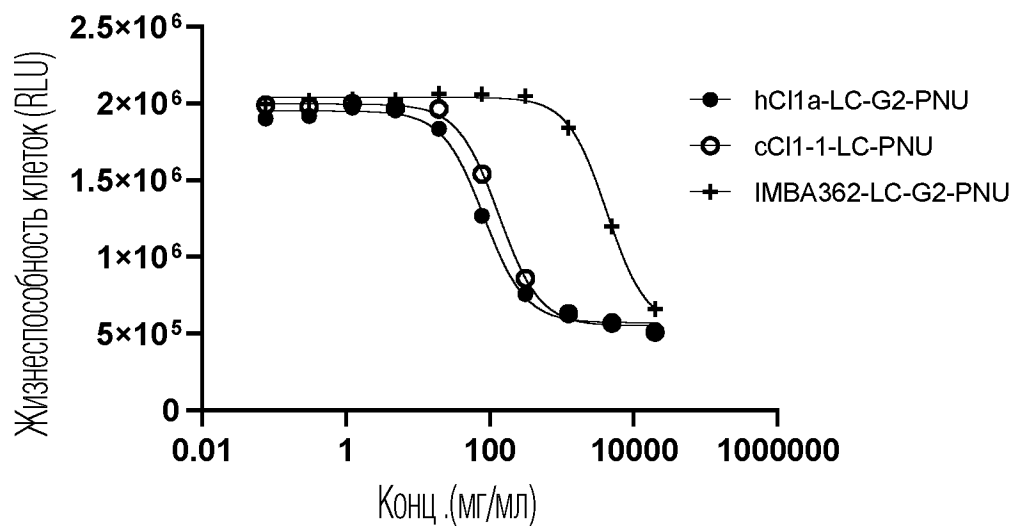
ФИГ. 19С

## HEK293T-CLDN18.1



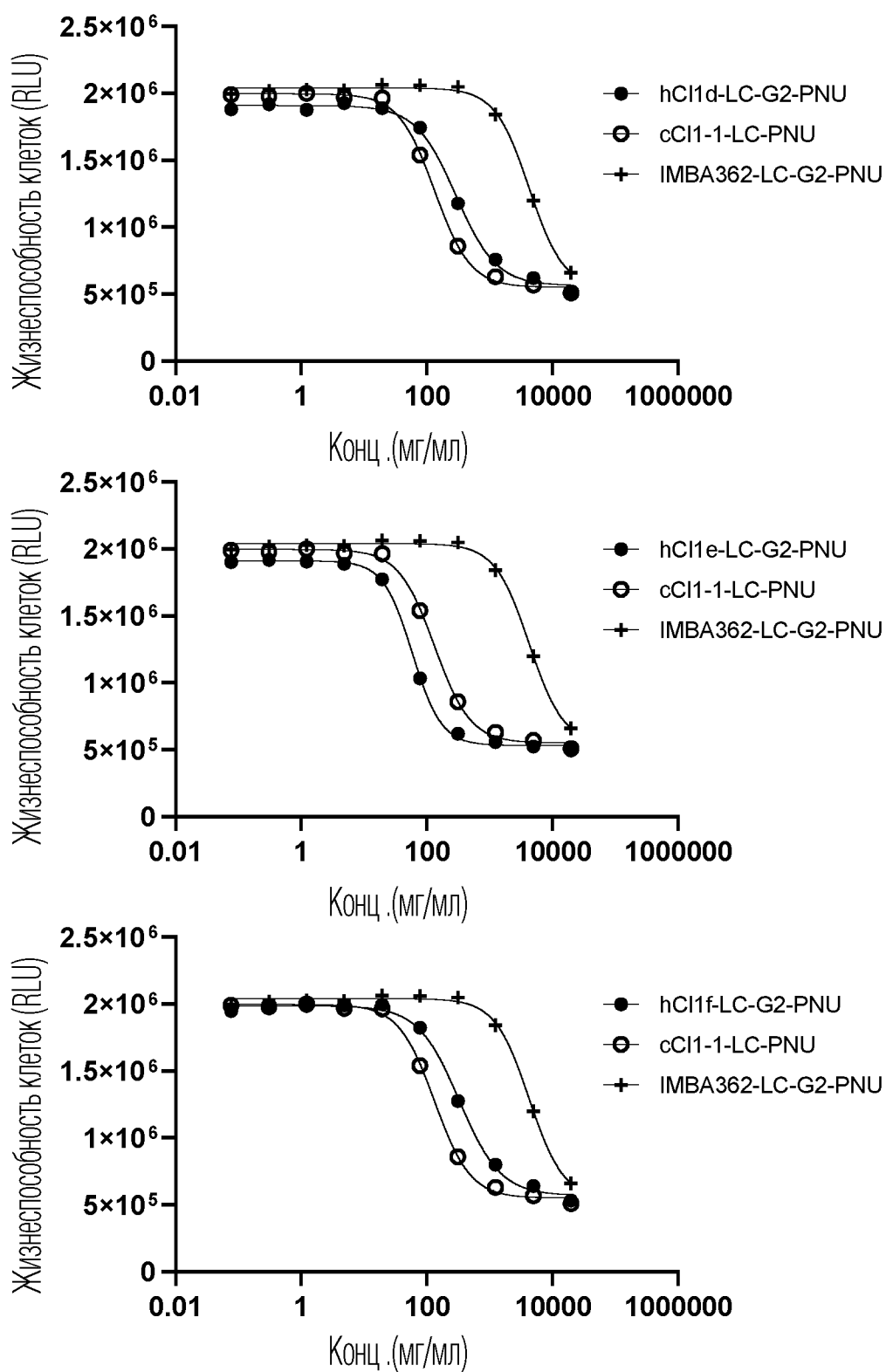
ФИГ. 19D

## PA-TU-8988S-High



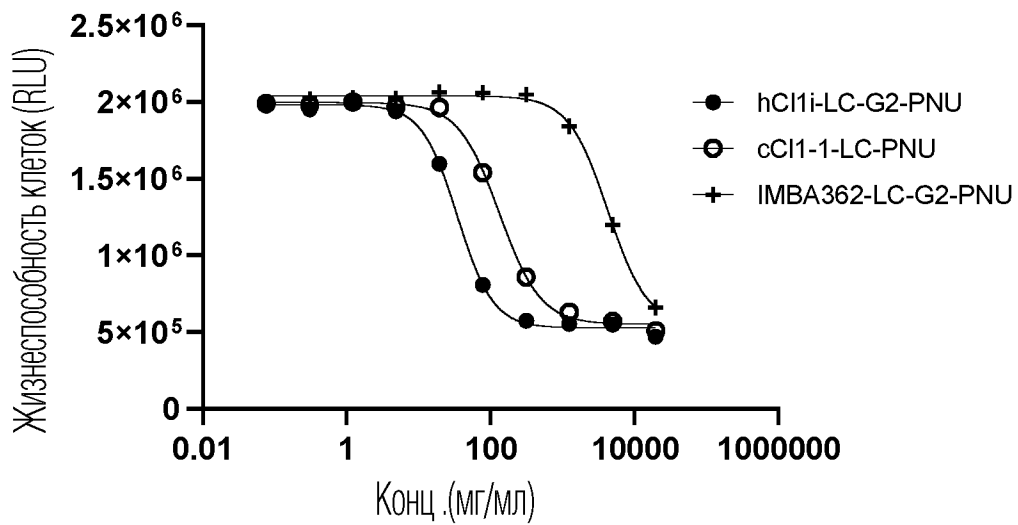
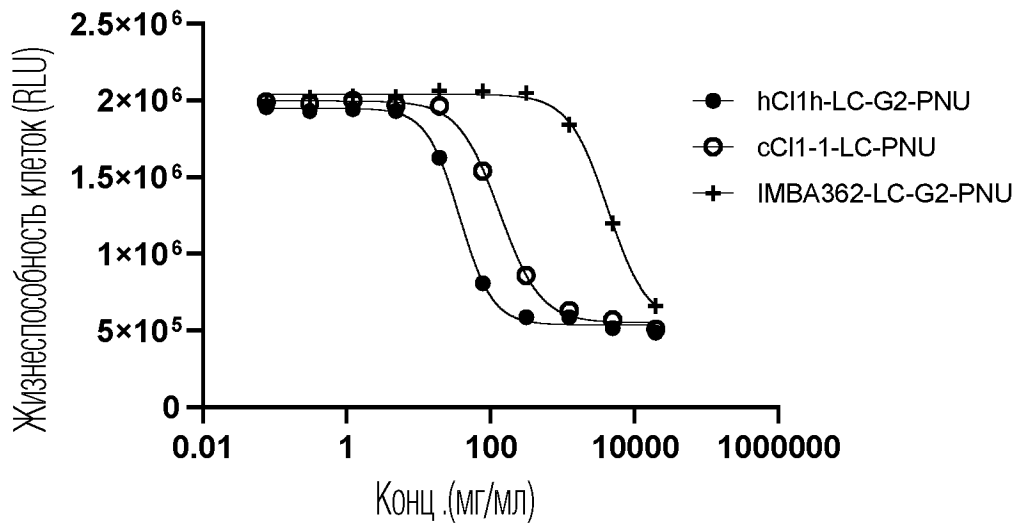
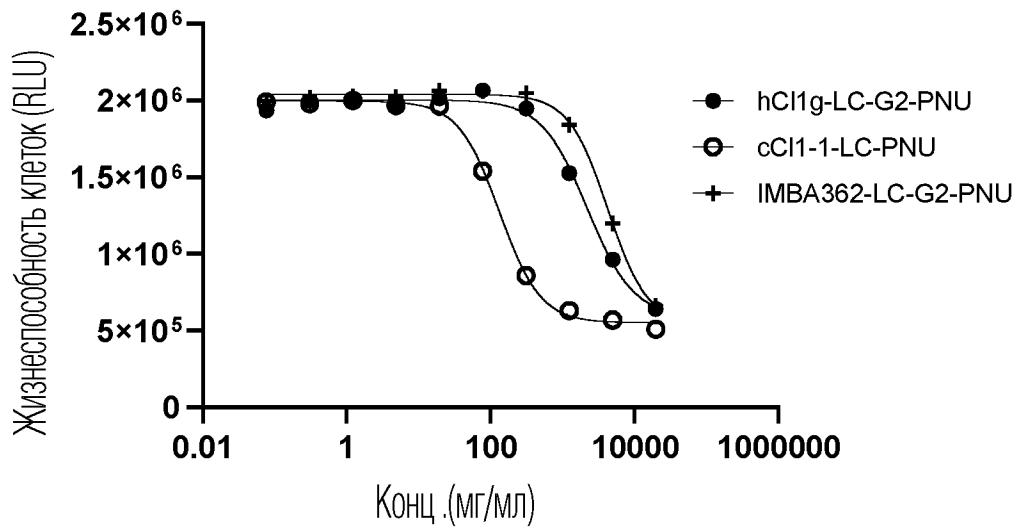
ФИГ. 20А

## PA-TU-8988S-High



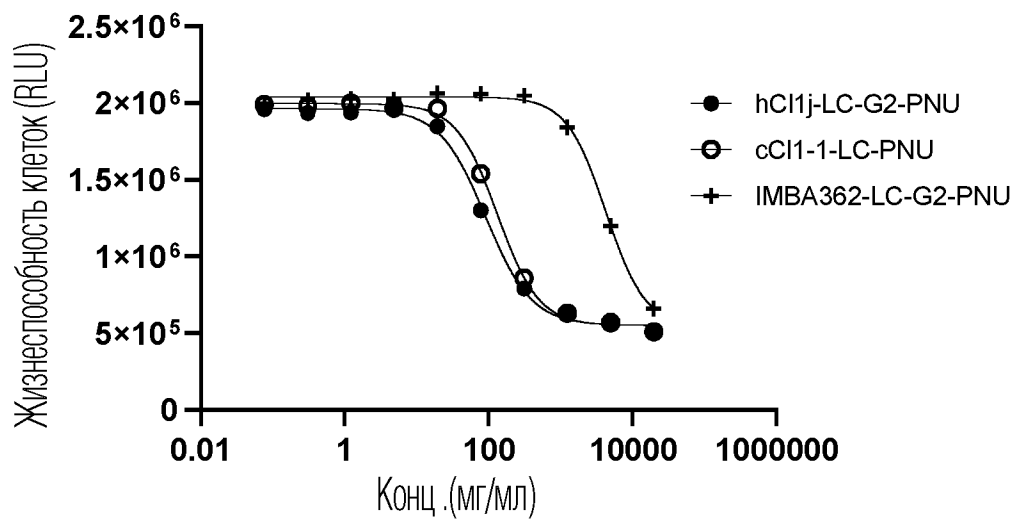
ФИГ. 20В

## PA-TU-8988S-High



ФИГ. 20С

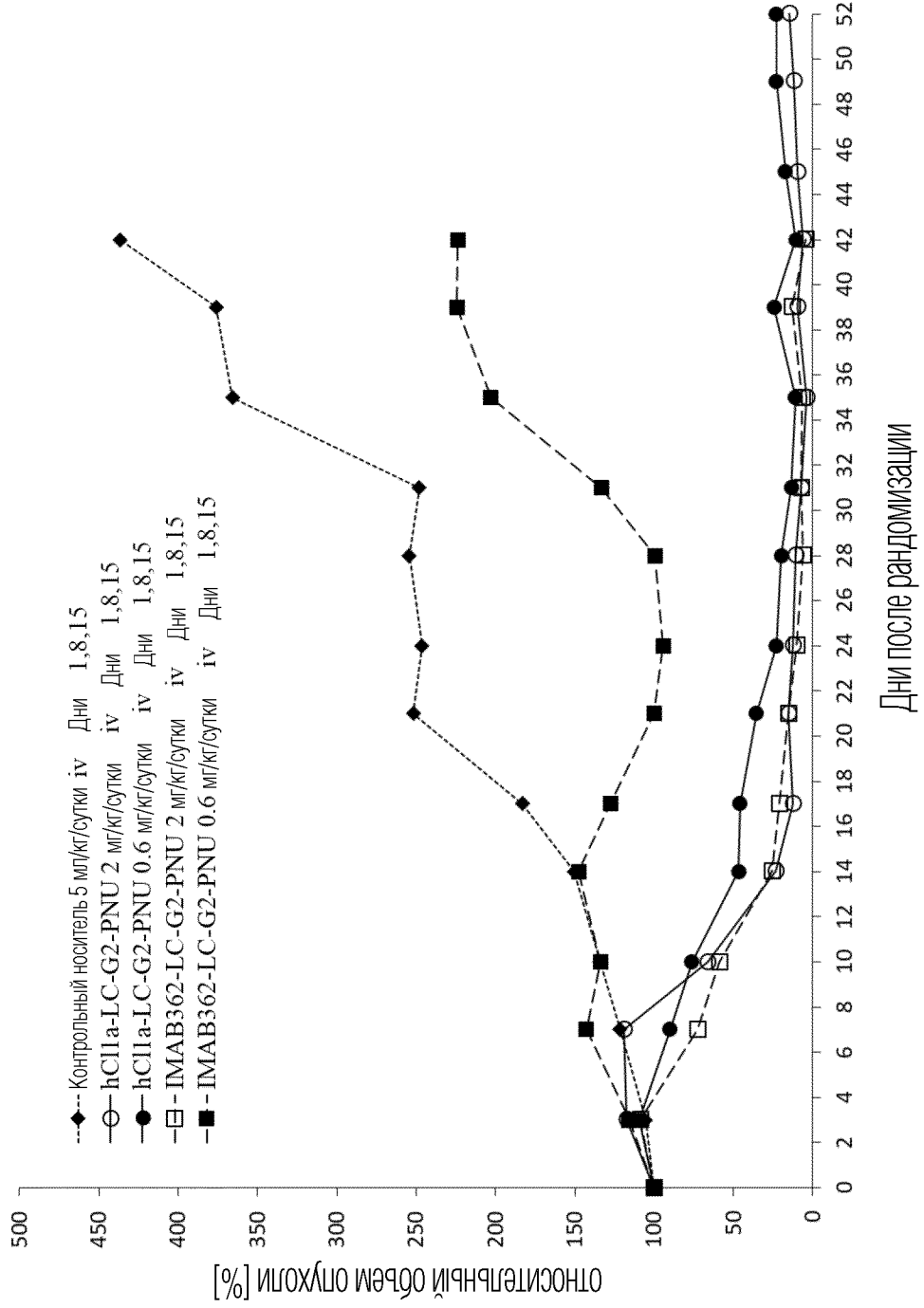
## PA-TU-8988S-High



ФИГ. 20D

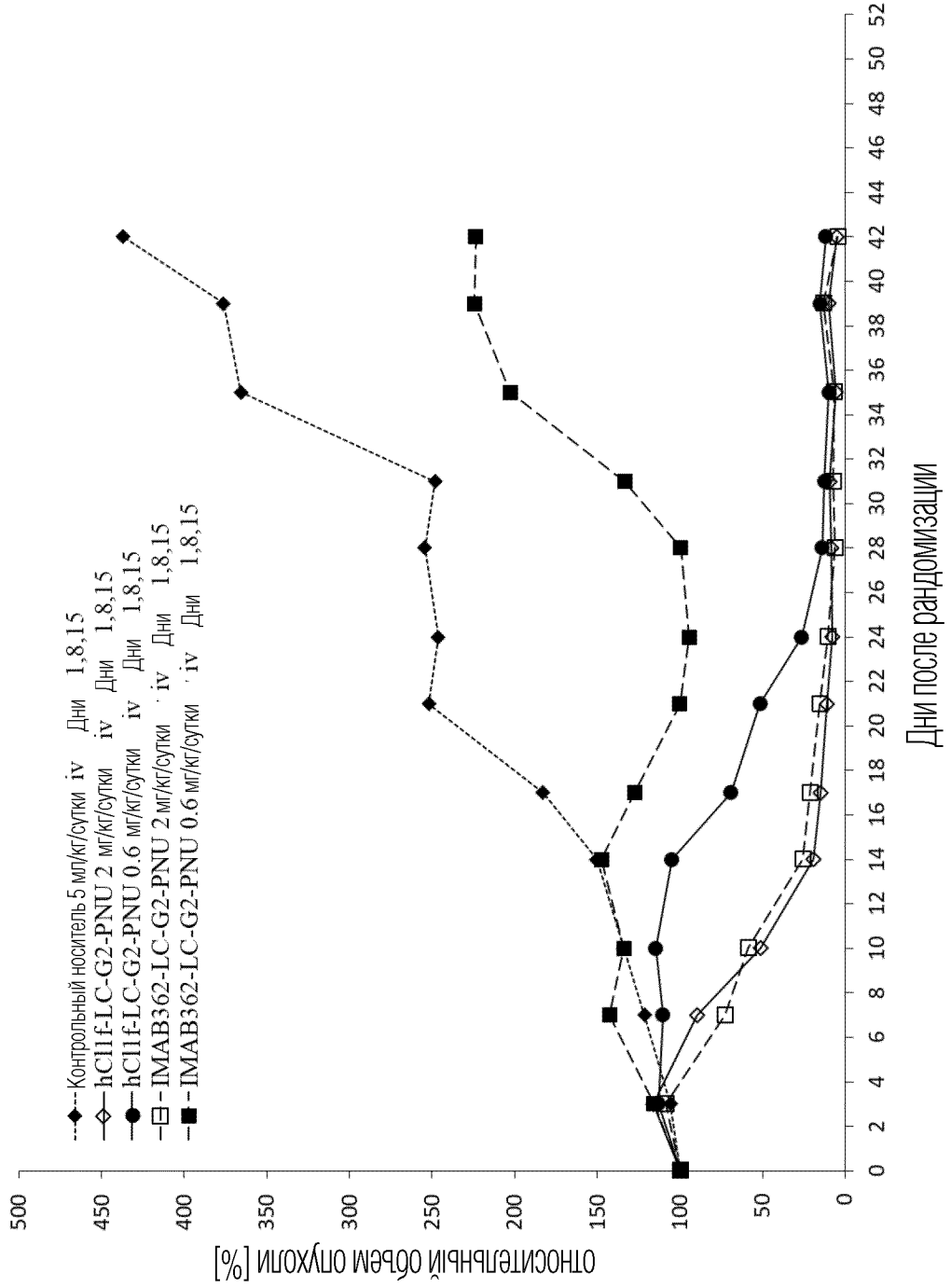


GXA 3037

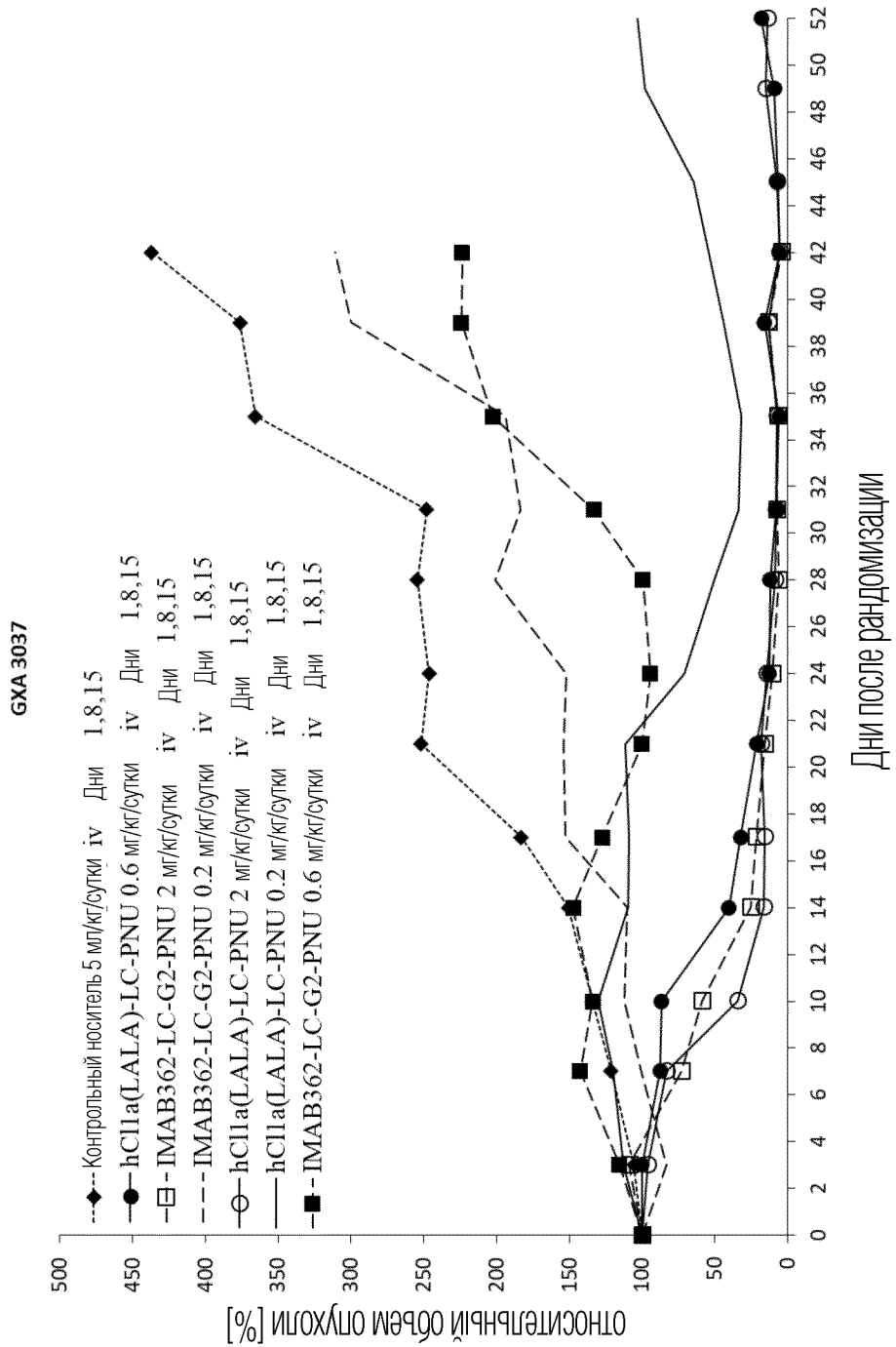


ФИГ. 21А

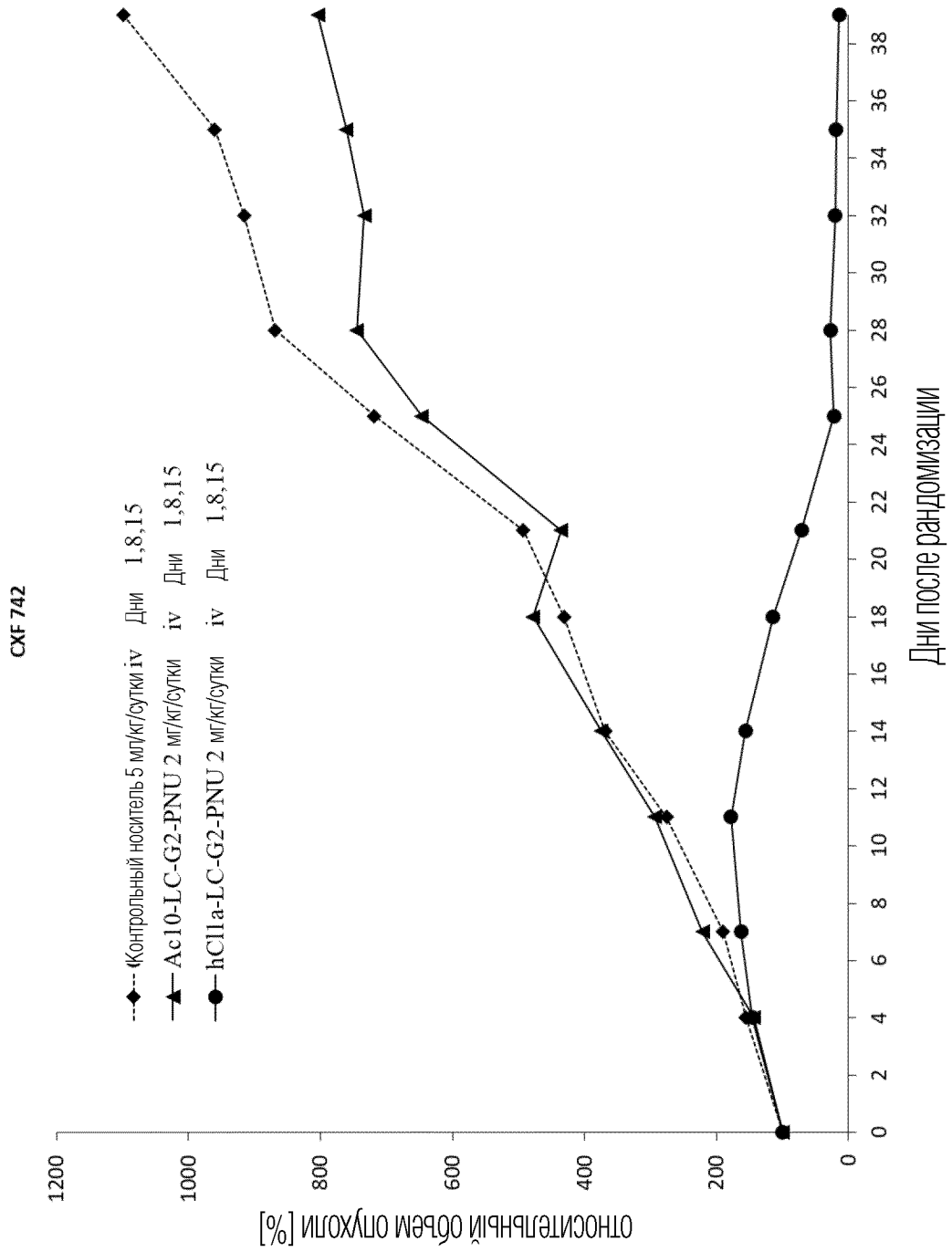
ГХА 3037



ФИГ. 21В

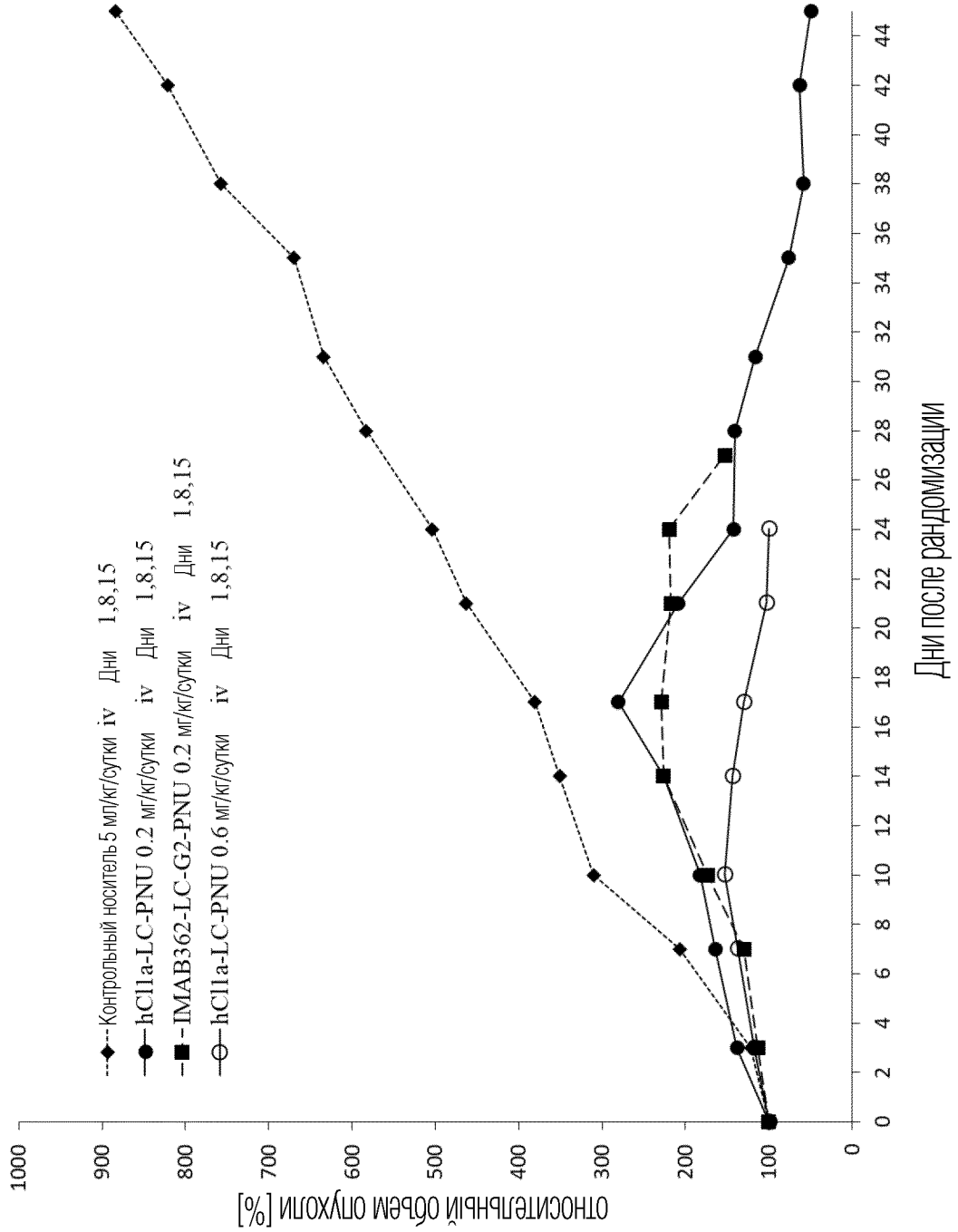


ФИГ. 21С

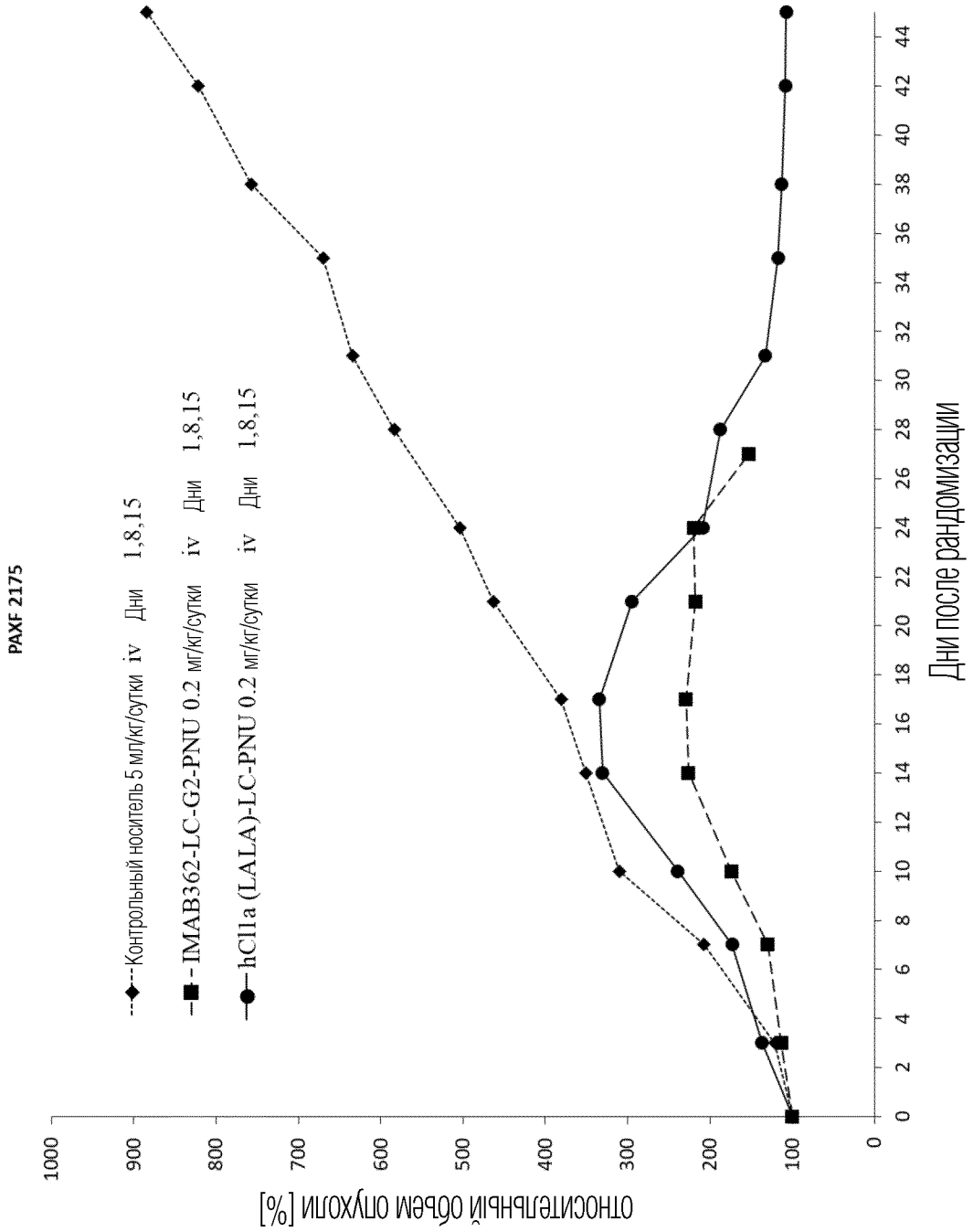


ФИГ. 22

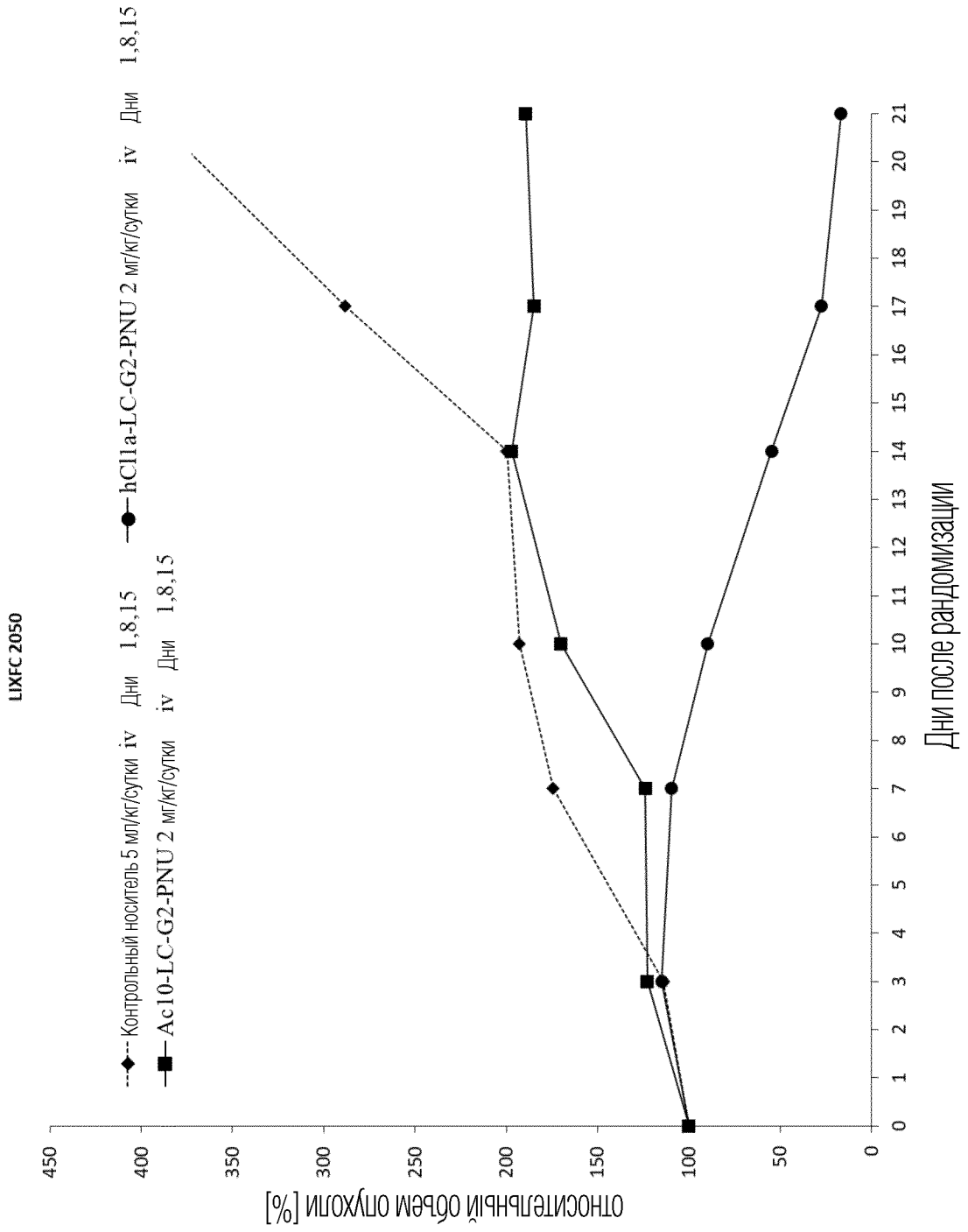
РАХФ 2175



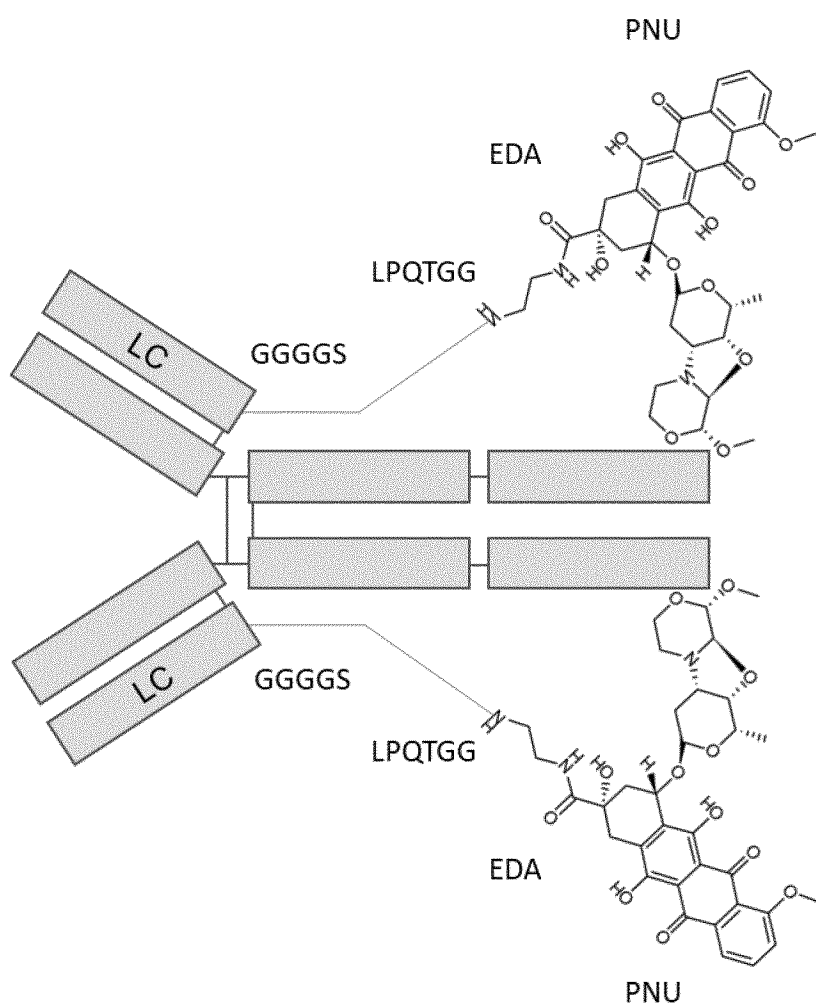
ФИГ. 23А



ФИГ. 23В



ФИГ. 24



ФИГ. 25