

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046743**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.17

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
202291668

(22) Дата подачи заявки
2020.12.23

(54) **ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2**

(31) **19219359.7; 20152510.2**

(32) **2019.12.23; 2020.01.17**

(33) **EP**

(43) **2022.08.23**

(86) **PCT/EP2020/087735**

(87) **WO 2021/130291 2021.07.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СОТИО БАЙОТЕК А.С. (CZ)

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

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

(56) SAHIN UGUR ET AL. "Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development", CLINICAL CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 23, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 7624-7634, XP002588324, ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-08-1547, cited in the application, the whole document

WO-A1-2013174509

WO-A1-2019174617

WO-A1-2013167259

WO-A1-2019173420

WO-A1-2019219089

HEWITT KYLE J. ET AL. "The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues", BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 12 July 2006 (2006-07-12), page 186, XP021016181, ISSN: 1471-2407, DOI:10.1186/1471-2407-6-186, cited in the application, the whole document

(57) Изобретение относится к опухолеспецифическим антителам против CLDN18.2 или их фрагментам. Антитела или их фрагменты демонстрируют повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2. Кроме того, антитела не демонстрируют перекрестную реактивность в отношении CLDN18.1. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и медицинскому применению.

B1

046743

046743

B1

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 РКС ζ . 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). Аминокислотную последовательность белка CLDN18.2 человека можно получать из референсной последовательности в NCBI: NP_001002026.1. Последовательность также приведена как SEQ ID NO: 133.

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, независимого от гликозилирования; пептида NNPVTAVFNQYQ (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 METDTLLLVWVLLWVPGSTGDAAQPARRRRTKLGTELGSPVWVNSADGRMDQWSTQDLYNNPV TAVFNQYQGLWRSCVRESSGFTFCRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQHSGGRSRRARTKTHLRRGSE (SEQ ID NO: 63), включающим первый внеклеточный домен CLDN18.2 с N- и С-концевыми удлиняющими сегментами. Полученные с помощью этой иммунизации антитела опосредуют цитотоксичность 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), LYNNPVTAVFNQYQGL (SEQ ID NO: 65), VFNYQGLWRSCVRES (SEQ ID NO: 66), QGLWRSCVRESSGFT (SEQ ID NO: 67) и RSCVRESSGFTFCRG (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 TEDEVQSYPSKHQYV (SEQ ID NO: 69) и EVQSYPSKHQYV (SEQ ID NO: 70). В WO2013/174509 приведены комбинации антител против CLDN18.2 со средствами, стабилизирующими γ β -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-цитруллин, 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 цитотоксический эффект посредством ADC. В WO2019/173420 описаны гуманизированные моноклональные антитела против CLDN18.2 с активностью ADC. 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.

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 предпочтительно 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 PTM. PTM 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, IMAB362 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.

Таким образом, существует потребность в улучшенных антителах, 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, мышинные, 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 вариabельными 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 γ 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')₂-фрагмент, являющийся бивалентным фрагментом, содержащим два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области (восстановление F(ab')₂-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 тандемных 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 триспецифические 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).

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 антитела против CLDN18.2, как описано в следующих вариантах осуществления, 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, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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 мышцы, 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 , ≥ 10 , предпочтительно - ≥ 15 , и более предпочтительно - ≥ 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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 HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки HEK293T, гиперэкспрессирующие CLDN18.2, можно получать, как описано в примере 3. Значение EC_{50} антитела по изобретению при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC) на клетках HEK293T, 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 по изобретению можно сравнивать со значением EC_{50} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, где значение EC_{50} антитела по изобретению 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} IMAB362, но не более чем в 5 раз выше значения EC_{50} IMAB362. 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} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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_{50} антитела по изобретению 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_{50} антитела по изобретению можно сравнивать со значением EC_{50} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High, где значение EC_{50} антитела по изобретению 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_{50} IMAB362. Значение EC_{50} антитела по изобретению 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_{50} IMAB362.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 со значениями $maxMFI$ в пределах $\pm 40\%$ значения $maxMFI$ IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 со значениями $maxMFI$ в ≤ 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. Опухольспецифические 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 антителу или его фрагменту, связывающемуся 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.

Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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 табл. 1. Следует понимать, что любое 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

CDR	Последовательность	SEQ ID
HCDR1	DYAMX X в 5-м положении является H или Y	SEQ ID NO: 21
HCDR2	WINXYTGKPTYXXXFXG X в 4-м положении является T или A; X в 12-м положении является A или S; X в 13-м положении является D или Q; X в 14-м положении является D или K; X в 16-м положении является K или Q	SEQ ID NO: 22
HCDR3	AVXYGYTMDA X в 3-м положении является F или Y	SEQ ID NO: 23
LCDR1	RXSEDIYSNXA X во 2-м положении является A или T; X в 10-м положении является L или F	SEQ ID NO: 24
LCDR2	XXXRLQD X в 1-м положении является S или A; X во 2-м положении является V или I; X в 3-м положении является K или N	SEQ ID NO: 25
LCDR3	LQGSXFPLT X в 5-м положении является K или N	SEQ ID NO: 26

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 фиг. 1 ниже приведены примеры кривых аффинности при анализе ELISA для антител с CDR, содержащимися в консенсусных последовательностях из табл. 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 табл. 1.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 и содержащему последовательности CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCR3 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

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;

с. 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;

д. 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;

е. 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;

ф. 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;

г. 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;

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: 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 еще одном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

а. 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

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 изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

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.

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.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, состоящему из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51.

Изобретение также относится к антителу, имеющему 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 изобретение относится к антителу, связывающемуся с

CLDN18.2 и имеющему 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 изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2 и имеющему 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 изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2 и имеющему 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 табл. 2 ниже. Таковую 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, при этом антитело представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистоающий 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 табл. 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
Усиление ADCC		
Повышенное связывание FcγRIIIa	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L S239D/I332E S298A/E333A/K334A в одной тяжелой цепи: L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D27	(Stavenhagen et al., 2007) (Lazar et al., 2006) (Shields et al., 2001) (Mimoto et al., 2013)

	0E/S298A, в противоположной тяжелой цепи: D270E/K326D/A330M/K334E	
Повышенное связывание FcγRIIIa сниженное связывание FcγRIIb	S239D/I332E/A330L	(Lazar et al., 2006)
Усиление ADCP		
Повышенное связывание FcγRIIa, повышенное связывание FcγRIIIa	G236A/S239D/I332E	(Richards et al., 2008)
Усиление CDC		
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	(Diebold et al., 2014)
Сниженная эффекторная функция		
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)
Повышенное время полужизни		
Повышенное связывание FcRn при pH 6,0	M252Y/S254T/T256E M428L/N434S	(Dall'Acqua et al., 2002) (Zalevsky et al., 2010)
Повышение совместного вовлечения		
Повышенное связывание FcγRIIb	S267E/L328F	(Chu et al., 2008)
Повышенное связывание FcγRIIa, сниженное связывание FcγRIIIa	N325S/L328F	(Shang et al., 2014)

Время полужизни антител 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)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc или (scFv)₂. 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 вариабельного 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 табл. 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 табл. 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, антителу, имеющему 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, имеющему мутации L234A/L235A в константной области тяжелой цепи CH2. Более предпочтительно, изобретение относится к антителу с константной областью тяжелой цепи CH1 и Fc-областью SEQ ID NO: 130, имеющему мутацию L234A/L235A/P329G в константной области тяжелой цепи CH1 и Fc-область с даже более сниженным связыванием с FcγR.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, состоящему 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся 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 изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, при этом антитело связывается 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 изобретение относится к опухолеспецифическому антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело менее склонно к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAB362. В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к опухолеспецифическому антителу или его фрагменту, связывающемуся 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, эпигированные 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. табл. 6) и изомеризации Asp (см. табл. 7), и что их аффинность связывания с CLDN18.2 не была затронута. С другой стороны, IMAB362 демонстрировало дезамидирование Asn в таких условиях, вызывающее потерю аффинности связывания (как видно в табл. 6 и на фиг. 10). Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их фрагментам, связывающимся с CLDN18.2 и менее восприимчивым, чем IMAB362, 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*).

Изобретение также относится к антителу, связывающемуся с тем же эпитопом, что и антителу, представленное в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антителу, 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 одном из вариантов осуществления изобретение 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 табл. 3. Последовательность нуклеиновой кислоты также может кодировать F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, 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.

В еще одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты также может кодировать конструкцию CAR, связывающуюся с CLDN18.2. Всестороннее руководство по конструированию CAR-T-клеток можно найти в Chang and Chen (2017) или June and Sadelain (2018). В одном из вариантов осуществления изобретение относится к T-клетке, генетически сконструированной для продуцирования искусственного T-клеточного рецептора, например, химерного антигенного рецептора (CAR), где искусственный T-клеточный рецептор содержит антитело или его функциональные фрагмент по настоящему изобретению, связывающееся с CLDN18.2.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к опухолеспецифическому связывающему белку на основе антитела, специфически связывающемуся с CLDN18.2. Такой связывающий белок может содержать по меньшей мере CLDN18.2-связывающий домен описанных

антител и другой белковый домен, не относящийся к антителам. Изобретение также относится к модифицированному формату антител, связывающемуся с CLDN18.2.

Изобретение также относится к экспрессирующему вектору, 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).

В другом варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, 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.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его фрагмент, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, или клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор, для использования в лечении индивидуума, страдающего неопластическим заболеванием.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его фрагмент, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, или клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор, для использования в лечении индивидуума, имеющего риск развития неопластического заболевания, и/или для использования в лечении индивидуума, у которого диагностировано неопластическое заболевание.

Описанные антитела или их фрагменты 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 антитела или его функционального фрагмента, связывающегося с CLDN18.2, где способ включает введение фармацевтически эффективного количества антитела или его функционального фрагмента нуждающемуся в этом индивидууму. Способ лечения может представлять собой монотерапию или, предпочтительно, комбинированное лечение с использованием установленного стандарта лечения неопластического заболевания.

Аминокислотную последовательность белка CLDN18.2 человека можно получать из референсной последовательности NCBI: NP_001002026.1. Последовательность также приведена как SEQ ID NO: 133.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1: Оценка связывания с липочастицами, содержащими CLDN18.2, или нуль-липochастицами 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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 HEK293T, стабильно экспрессирующих CLDN18.1. С. Профиль FC трансфицированных клеток HEK293T, стабильно экспрессирующих CLDN18.2.

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

Фиг. 5: Анализ связывания посредством проточной цитометрии гуманизированных антител hC11a-hC11j с клетками HEK293T, гиперэкспрессирующими CLDN18.1 или CLDN18.2. Гуманизированные антитела связываются с CLDN18.2, но не CLDN18.1. IMAВ362 и сС11-1 использовали в качестве положительного контроля связывания.

Фиг. 6: Профили экспрессии FACS клеток А549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки А549, неэкспрессирующие CLDN18.2 эндогенно, стабильно трансфицировали с помощью плазмиды, кодирующей CLDN18.2, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством FACS с использованием IMAВ362.

Фиг. 7: Окрашивание живых клеток посредством проточной цитометрии. На графике показана процентная доля выделенных отдельных клеток, связанных антителами против CLDN18.2 (сС11-1, hC11a, hC11b, hC11c, hC11f и IMAВ362). Отдельные клетки выделяли из опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, развившейся из инъекцированных клеток А549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (закрашенные столбики), или здорового желудка мыши, экспрессирующего CLDN18.2 (незакрашенные столбики).

Фиг. 8: Окрашивание замороженной ткани желудка. Препараты замороженной здоровой ткани желудка мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (А), hC11b (В), hC11c (С), hC11f (D) или IMAВ362 (Е). Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фиг. 9: Окрашивание замороженной опухолевой ткани, развившейся из инъекцированных клеток А549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Препараты замороженной ткани опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (А), hC11f (В), IMAВ362 (С) или антитела против пан-CLDN18 Abcam34Н14L15. Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фиг. 10: Эффект дезамидирования в отношении активности связывания IMAВ362. После дезамидирования аффинность IMAВ362 к CLDN18.2 снижается.

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 клона идентифицировали как являющиеся CLDN18.2-специфическими, что приводит к получению химерных антител, названных сС11-1, сС11-2 и сС11-3, со схожими CDR (см. табл. 3). Затем сС11-1, сС11-2 и сС11-3 гуманизировали, получая 10 гуманизированных клонов, названных антителами hC11a, hC11b, hC11c, hC11d, hC11e, hC11f, hC11g, hC11h, hC11i и hC11j (см. табл. 3).

В качестве контроля синтезировали антитело IMAВ362 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
сС11-1		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISKASGYTFTDYAMHWVKQAP GKGLKWMGWINTYTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQ ISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 27
HCDR1	gactacgcatcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgactcaagggg	SEQ ID NO: 72
HCDR3	gccgtctctacggatatacgtggacgcg	SEQ ID NO: 73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccggggagagcgtgaagatctc gtgcaagggcagcggatatacgttcacggactacgcgactgggtcaagcaagcggggg gaaagggctgaagtggatggggtgatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacg	SEQ ID NO: 74

	acttcaaggggagattcgtgttctcgtggaggcagcgcgagcacggcgaaactgcaaatctc gaaactgaagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggccttctacggatatac atggacgcgtggggcaggggtaccagcgtgacgggtctcgagc	
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWYQKSGKS PQLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDY FCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 28
LCDR1	cgggagcagcaggacatctactcgaactggcg	SEQ ID NO: 75
LCDR2	tccgtcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO: 76
LCDR3	ctgcaagggagcaactcccgtgacg	SEQ ID NO: 77
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgtcgtgagcgcgagcctgggggagacgatctcgat cgcgtgccgggagcagcaggacatctactcgaactggcgtggtatcaacagaagcggga agagcccagcgtgctgatcttccgtcaagcggctgcaagacggcgtcccagcggattctc ggggagcgggagcgggagcagctactcgtgaagatctcggggatgacggcggagcagc ggggacttctcctgcaagggagcaactcccgtgacgttcggggtcgggtaccaactcg agatcaaa	SEQ ID NO: 78
cC11-2		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 7
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFDYMHWVKQGP KGMKWMGWINAYTGKPTYADDFKGRFVLSLEASASTANLQI SNLKNEDTATYFCARAVYYGYTMDAWGQGTSVIVSS	SEQ ID NO: 29
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaacgcgtacacggggaagccgacctacgcggacgactcaagggg	SEQ ID NO: 79
HCDR3	gccgtctactacggatatacggatgac	SEQ ID NO: 80
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctc gtgcaagacgagcggatatacgttcacggactacgcgatgactgggtcaagcaggggccagg gaaagggatgaagtggatggggtggatcaacgcgtacacggggaagccgacctacgcggac actcaaggggagattcgtgctgagcctggaggcagcgcctcgcggcgaactgcaaatctc gaaactgaagaacgaggacagcgcgacttctgcgcggggcctcactacggatatac atggacgcgtggggcaggggtaccagcgtgatcgtctcgagc	SEQ ID NO: 81
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO: 9
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO: 10
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQKSGKSP QLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYF CLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 30
LCDR1	cggagcagcaggacatctactcgaactcgcg	SEQ ID NO: 82
LCDR2	tcagtcaaccggctgcaagac	SEQ ID NO: 83
LCDR3	ctgcaagggagcaagtcccgtgacg	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgat cgagtgccggagcagcaggacatctactcgaactcgcgtggtccagcagaagagcgggaa gagcccagcgtgctgatctactcagtaaccggctgcaagacggcgtcccagcggattctcg gggagcgggagcgggagcagctactcgtgaagatctcggggatgacggcggagcagc gggacttctcctgcaagggagcaagtcccgtgacgttcgggagcgggtaccaactcga gatcaaa	SEQ ID NO: 85
cC11-3		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISKASGYTFDYMHWVKQVPG KGLRWMGWINTYTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQIS NLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 31
HCDR1	gactacgcgatgtac	SEQ ID NO: 86
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcggacgactcaagggg	SEQ ID NO: 87
HCDR3	gccgttctactacggatatacggatgacgcg	SEQ ID NO: 73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctc	SEQ ID NO: 88

	gtgcaaggcgagcggatatacgttcacggactacgcgatgtactgggtcaagcaagtgccgggg aaaggctcgcgatggatggggtggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgggacga ctcaaggggcgattcgtgttctcgtggaggcgaagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctcg aacctgaagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggcgtctctacggatatacga ggacgcgtggggcagggtaccagcgtgacggctcgcgagc	
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 13
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIA CRTSEDIYSNLAWYQQKSGKSP QLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYF CLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 32
LCDR1	cggacgagcaggacatctactcgaacctggcg	SEQ ID NO: 89
LCDR2	gcgatcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO: 90
LCDR3	ctgcaaggagcaagtcccgcctgacg	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgat cgcgtgccggacgagcaggacatctactcgaacctggcgtggtatcaacagaagagcgggaa gagcccgcagctgctgatcttcgcatcaagcggctgcaagacggcgtcccagccgattctcg gggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagg gggacttctgctgcaaggagcaagtcccgcctgacgttcgggtcgggtaccaactcgag atcaaa	SEQ ID NO: 91
hC11a		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 15
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 33
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 46
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaatacatacaggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 92
HCDR3	gcggtctctacggatatacggatgcc	SEQ ID NO: 93
VH	caggtccaactagtcaaaagcggggcggaagtcaagaagcccggagcattcgaagtgcgc tgcaagcgcgagcggatatacattacggactacgcgatgcactgggtcaggcaagcccctgggc aaaggctcgaatggatggatggatcaatacatacaggggaagccgacttatgcgcaaaaattc caagggaagatcaattacgcgggatacatcccatctaccgctacatggagctaagctcgt gcggagcaggatacggcggtctactattgcgccgagcgggtctctacggatatacggatg cctggggcagggtaccctggteacggctcgcgagc	SEQ ID NO: 94
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 51
LCDR1	aggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95

LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagccatcatcgctgagcgcacggtcggggatagagtcaccataac atgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaacaaaaccggggaaggct ccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagtaccgagccgatttccgggaag cgggagcgggacggatttcacgctgaccatatcaagtttgcaaccggaggatttgcgacatacta ttgcttgaaggaagcaatttccccttgacttccggcaaggtaccaaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hC11b		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGTLTVSS	SEQ ID NO: 34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGTLTVSSAST KGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTLKVDDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 47
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagccacatactccaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101
VH	caggccaattagtcctaaagcggggcgggaagtcaagaagccggggcgagcgtcaaatgctca tgcaaaagcagcggatacacatttagcattatgcaatgcaactgggtcaggcaagcaccggac aaaggctggaatggatggatggatgaacacctacacgggcaagccacatactccaaaaattc caaggaaaggtcacgataacgagagacagcgcgagcaccggaatggatggatggatga aacctacacgggcaagccacatactccaaaaattccaaggaaggtcacgataacgagag acagagcgcgagcaccgtacctggcaccgtctcgagc	SEQ ID NO: 102
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPKGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPKGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 51
LCDR1	agggectccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagccatcatcgctgagcgcacggtcggggatagagtcaccataac atgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaacaaaaccggggaaggct ccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagtaccgagccgatttccgggaag cgggagcgggacggatttcacgctgaccatatcaagtttgcaaccggaggatttgcgacatacta ttgcttgaaggaagcaatttccccttgacttccggcaaggtaccaaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hC11c		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASASTAYM	SEQ ID NO: 34

	ELSSLRSEDТАVYYCАRАVFGYТMDАWGQGLTVSS	
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDТАVYYCАRАVFGYТMDАWGQGLTVSSAST KGPSVFLPASPSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 47
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101
VH	caggccaattagtcacaagcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtcaaatctca tgcaagcgagcggatacacattacggattatgcaatgactgggtcaggcaagcaccgggac aaaggctggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattc caaggaaagggcagatacagagacacgagcgcgagcaccggaatggatggatggatta acacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagag acacgagcgcgagcaccgtaccctggcaccgtctcgagc	SEQ ID NO: 102
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKA PKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC LQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 39
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKA PKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC LQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 52
LCDR1	cgaacgagcaggacatatactcaaaccttgca	SEQ ID NO: 103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO: 104
LCDR3	ttgcaaggctccaaattcccctgaca	SEQ ID NO: 105
VL	gacatccaaatgactcaagcccatcatcgctatcgatcggatcgggtagatgacgataac atgccgaacgagcaggacatatactcaaaccttgcatggtatcaaaaaagccggggaaggcc ccgaagctactgataatcgcgataaagaggctgcaagacggagtccatcagattttcgggatct ggctcgggaccgattttacgctgactatatcatcgctgcaaccggaagattttgcaacatactact gcttgcaaggctccaaattcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 106
hCl1d		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDТАVYYCАRАVFGYТMDАWGQGLTVSS	SEQ ID NO: 34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDТАVYYCАRАVFGYТMDАWGQGLTVSSAST KGPSVFLPASPSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 47
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101

	YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagccatcatcgctgagcgcacggtcggggatagagtcaccataac atgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaacaaaaccggggaaggct ccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagtaccgagccgatttccgggaag cgggagcgggacggatttcacgctgaccatatacaagttgcaaccggaggatttgcgacatacta ttgcttgaaggaagcaatttccccttgacttccgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hC11f		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITDYAMHWVRQAPGQRL LEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 36
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFITDYAMHWVRQAPGQRL LEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 49
HCDR1	gactacgcaatgac	SEQ ID NO: 114
HCDR2	tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 115
HCDR3	gccgtctctatggatatacggatgct	SEQ ID NO: 116
VH	caggccaattggtccaaagcggggcggagggtcaagaagcggggcggagcgtcaagtctc atgaagcgaagcgatatacattacggactacgcaatgactgggtccggcaagccctggg caacggctggaatggatggatgattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaat tcaaaggacgagtcacgattacgctgatactgctgagcaccgcatataggagctaagctc gctgctgctgagataccgctgtatactgctgagcagagccgcttctatggatatacggat gctggggcaggggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO: 117
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAHWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGTDFLTITSSLPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 41
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAHWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGTDFLTITSSLPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 54
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaactggct	SEQ ID NO: 118
LCDR2	agcgtcaaaaggtccaagac	SEQ ID NO: 119
LCDR3	ctacaaggtctaaactcccattgaca	SEQ ID NO: 120
VL	gatatccaaatgacgcaatcaccatctagcctatcggcctctgtgggggaccgagtcaccatcaca tgccgagcttcggaggacatctatagcaactggcttggatcaacaaaagccggggaagcacc aaagctgctgatatagcgtcaaaaggtccaagcggaggtcccaagccgattctcgggctccg gctccgggacggattttagcgtgacaatttcgagcctgcaaccggaggacttgcaccctactattg cctacaaggtctaaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 121
hC11g		

HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 36
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 49
HCDR1	gactacgcaatgcac	SEQ ID NO: 114
HCDR2	tggaatgacgtacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 115
HCDR3	gccgtctctatggatatacgaatgct	SEQ ID NO: 116
VH	caggtccaattggtccaagcggggcggaggtcaagaagccggggcggagcgtcaaatgctc atgcaaggcaagcggatatacattacggactacgcaatgactgggtccggcaagccctggg caacggctggaatggatggatggatggaatgctacacggggaagccgacctacgcacaaaaat tccaaggacgagtcacgattacgaggatacagcgcgagcaccgcatataggagctaaagtc gctgcgactgaggataaccgctgtactactgcgcgagagccgtctctatggatatacgaatg gctggggcagggtaccctggtcaggtctcagc	SEQ ID NO: 117
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO: 18
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO: 19
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSEDIYSNFAWYQQKPGKA PKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 40
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSEDIYSNFAWYQQKPGKA PKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 53
LCDR1	cggacgagcgggatatttattcgaactttgca	SEQ ID NO: 107
LCDR2	cagtcaatcggctacaagat	SEQ ID NO: 108
LCDR3	ctacaaggagcaaatcccgtgaca	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccaatgacgcaatcaccgagctcgtgagcgcacatctgctggggaccgtgcacaatcac atgccggagcagcgggatatttattcgaactttgcatggtatcaacaaaaccgggcaagctcc gaaactttgatttattcagctcaatcggctacaagatggcgtcccggagccgatttagcgggagcgg atcgggaaccgacttacgctgacgatcatcgtacaaccggagcacttcgcgacttattactgc ctacaaggagcaaatcccgtgacattcggacaaggtaccaaggtcggatcaaaa	SEQ ID NO: 109
hC11h		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY	SEQ ID NO: 50

	PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggtccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagcccggagcatccgtcaaaagtctcgtg caaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccggcaagccccggacaac ggctggaatggatgggatggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaa ggaagggtcacgattacgcgggacacgagcgcctcaaccgcatacatggagctatcgcgacctg cgaagcgaggacaccgcggtctactactgcgcgcccggctctactatggatatac gatggacg catgggggcaggggtaccctggtcaggtctcgcgac	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 41
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEHKVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 54
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaactggct	SEQ ID NO: 118
LCDR2	agcgtcaaaaggctccaagac	SEQ ID NO: 119
LCDR3	ctacaaggctctaactcccattgaca	SEQ ID NO: 120
VL	gatatccaaatgacgcaatcaccatctagcctatcgccctctgtgggggaccgagtcaccatcaca tgccgagcttcggaggacatctatagcaactggcttggatcaaaaaagccgggaaagcacc aaagctgctgatataatagcgtcaaaaggctccaagacggagtcaccaagccgattctcgggtccg gctccgggacggatttacgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggacttgcacactactattg cctacaaggctctaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 121
hCIIi		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 50
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggtccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagcccggagcatccgtcaaaagtctcgtg caaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccggcaagccccggacaac ggctggaatggatgggatggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaa ggaagggtcacgattacgcgggacacgagcgcctcaaccgcatacatggagctatcgcgacctg cgaagcgaggacaccgcggtctactactgcgcgcccggctctactatggatatac gatggacg catgggggcaggggtaccctggtcaggtctcgcgac	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5

LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYSNLAWYQQKPGK APKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 51
LCDR1	aggcctccgaagacatctactccaacctgga	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaaagccatcatcgctgagcgcacggctgggatagagtcaccataac atgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcacaaaaaccggggaaggct ccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagtagccgatttccgggaag cgggagcgggacggatttcacgctgaccatatacaagttgcaaccggagatttgcgacatacta ttgctgcaaggaagcaatttccccttgacttccggcaaggtaccaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hC11j		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLTVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQA PGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 50
HCDR1	gactacgctatgat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggtccaactggtcaatctggagcggaaagcaagaagccggagcatccgcaaaagtctcgtg caaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccggcaagccccggacaac ggctggaatggatggatggatgaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaatttcaa ggaagggtcacgattacgcgggacacgagcgcctcaaccgatacatggagctatcgagcctg cgaagcaggacaccgcggtctactactgcgcggggcggctactatggatatac gatggacg catggggcagggtaccctggteacggctcgcgac	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKA PKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 39
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKA PKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 52
LCDR1	cgaacgagcaggacataactcaaaccttga	SEQ ID NO: 103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO: 104
LCDR3	ttgcaaggctcaaatcccctgaca	SEQ ID NO: 105
VL	gacatccaatgactcaaaagccatcatcgctatcgcatcggctcgggatagagtcacgataac	SEQ ID NO: 106

atgccgaacgagcgaggacataactcaaaccttgcattgatcaacaaaagccggggaaggcc ccgaagctactgataatcgcgataaaggctgcaagacggagttccatcacgatttccgggatct ggctcggggaccgattttacgctgactatatcatcgctgcaaccggaagatttgaacatactact gcttcaaggctccaaattcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcagatcaaa

Антитела, дополнительно описанные в примерах 2-5, модифицировали так, чтобы они содержали метку RLPQTGG (SEQ ID NO: 131) на С-конце НС и/или метку GGGGSLPQTGG (SEQ ID NO: 132) на С-конце LC. С-концевой лизин (K) на НС 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 M H₂SO₄ с последующим считыванием OD при 490 нм на спектрофотометре для чтения планшетов для ELISA. Типичные кривые связывания показаны на фиг. 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 (EC₅₀) 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. фиг. 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 (фиг. 2B). После сортировки собранные клетки PA-TU-8988S-High ресуспендировали в средах для выращивания, подвергали экспансии и замороженные аликваты сохраняли в жидком N₂. Клетки HEK293T, гиперэкспрессирующие CLDN18.2 или CLDN18.1, получали, как описано в примере 3, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством проточной цитометрии (фиг. 3).

Для количественного анализа связывания антител с CLDN18.2 250×10³ клеток/лунку клеток HEK293T, 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 высевными 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. фиг. 5 и табл. 4) показал, что антитела hCl имеют более высокое значение EC₅₀, 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 EC₅₀ (мкг/мл), измеренные для всех антител hCl и IMAB362, на линиях клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, и линиях клеток PA-TU-8988S-High

Антитело	HEK293T-CLDN18.2		PA-TU-8988S-High	
	Max MFI	EC ₅₀ (мкг/мл)	Max MFI	EC ₅₀ (мкг/мл)

IMAB362	1968	0,3878	1046	0,5082
hC11a	1879	0,5976	1649	2,431
hC11b	1859	0,5715	1724	1,984
hC11c	1233	0,7531	1048	1,472
hC11d	1642	0,5411	1530	1,933
hC11e	1935	0,5583	1862	2,241
hC11f	1721	0,7948	1602	2,144
hC11g	1438	0,6779	1254	1,77
hC11h	2076	0,4325	1949	1,75
hC11i	2175	0,4437	2087	1,231
hC11j	1848	0,4081	1705	1,157

Пример 3: Получение пре-B-клеток L11 и клеток HEK293T, стабильно экспрессирующих hCLDN18.1 и hCLDN18.2; тестирование специфичности связывания химерных и гуманизированных антител.

Линия пре-B-клеток L11 (Waldmeier et al., 2016) и линия клеток HEK293T (ATCC CRL-3216TM) не экспрессируют CLDN18.1 или CLDN18.2 эндогенно. Таким образом, для тестирования связывания антитела CLDN18.1 и CLDN18.2 рекомбинантно гиперэкспрессировали в этих линиях клеток. 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% CO₂ в случае клеток L11 и атмосфере 5% CO₂ в случае клеток HEK293T. Трансфекцию подтверждали посредством анализа FC экспрессии EGFP. Затем клетки, экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2, подвергали селекцию 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. фиг. 3). В кратком изложении, трипсинизированные клетки HEK293T 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 FACSCaliburTM (см. фиг. 4 (см. фиг. 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. фиг. 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 (фиг. 4) и гуманизированные антитела (фиг. 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 IMAB362, и с по меньшей мере такой же хорошей аффинностью, что и cC11-1 (фиг. 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-185TM) 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% CO₂. 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 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) 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™ (см. фиг. 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 1×10^6 клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, в 100 мкл 50% матригеля и рост опухолей подвергали мониторингу в течение нескольких недель до достижения опухоли желаемого размера 150-450 мм³. 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/луночку 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/луночку 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 фиг. 7 и в табл. 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. Различия 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 табл. 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	Соотношение для	Соотношение для

							мыши 1	мыши 2	среднего значения
cCl1-1	37	15	26	0,4	0,3	0,35	92,5	50	74,3
hCl1a	34	18	26	1,2	0,3	0,75	28,3	60	34,7
hCl1b	43	17	30	1	0,13	0,565	43	130,7	53,1
hCl1c	29	8	18,5	0,1	0,4	0,25	290	20	74
hCl1f	32	14	23	0,04	0,1	0,07	800	140	328,6
IMAB362	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 1×10^6 клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, быстро замораживали в OCT в подходящей форме для ткани. Тканевые срезы толщиной 5-15 мкм нарезают с помощью криостата при -20°C , переносят на предметное стекло при комнатной температуре (RT), а затем держали замороженным до окрашивания ИНС. Перед окрашиванием стекла переносят обратно в RT и фиксируют предварительно охлажденным ацетоном (-20°C) в течение 10 мин. После испарения ацетона при RT стекла промывают TBS и обрабатывают для блокирования неспецифических участков окрашивания: препараты инкубировали в 0,3% H_2O_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 докрасивали гематоксилином, промывали dH_2O 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 фиг. 8 и фиг. 9, соответственно.

На фиг. 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 мембранное 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 фиг. 9 показано типичное окрашивание опухолевой ткани, панели 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-изомеризации 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, 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 Asp-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 (Asp-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. Asp-дезамидирование и Asp-изомеризация образцов анализировали посредством хроматографии с сильным катионным обменом (SCX). Дезамидирование Asp 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. табл. 6), что не классифицировали как критическое. Однако IMAB362 демонстрировало выраженное повышение bM 40,9% (см. табл. 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)

mAb	Стресс Да (+)/нет(-)	Доля bM (%)	Повышение доли bM после стрессового теста (%)
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 Asp-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 mM 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 H₂SO₄ и считывание осуществляли при OD-490 с помощью спектрофотометра для чтения планшетов для ELISA. Значение EC₅₀ IMAB362 было в 1,8 раз выше после стрессового теста дезамидирования (неподвергнутый стрессу референс: EC₅₀ 51,5 нг/мл, подвергнутый стрессу: EC₅₀ 95,09 нг/мл) (см. фиг. 10). Это может быть связано с повышением bM 40,9% при SCX после стрессового теста дезамидирования (см. табл. 6). Подтверждая результаты SCX в отношении Asp-дезамидирования, не наблюдали значимых различий связывания антигена после стрессового теста дезамидирования hC11a и hC11i (см. табл. 6). Таким образом, стрессовый тест дезамидирования показал, что антитела hC1 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 hC1 имели потенциальный мотив Asp-изомеризация DG во 2-й 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. табл. 7) в отличие от прогнозируемого из Du et al. (Du et al., 2012). Значения aM неподвергнутых стрессу образцов (за исключением IMAB362) являлись уже значимо высокими. Это может являться результатом вариантов тяжелой цепи с лизинным клиппированием. IMAB362 являлось единственным антителом без высокой aM в неподвергнутом стрессу образце. IMAB362 являлось единственным тестируемым антителом против CLDN18.2 без C-концевого Lys, что позволяет предполагать, что в случае антител hC1 клиппирование C-концевого Lys является наиболее вероятной причиной повышенной aM в неподвергнутых стрессу и подвергнутых стрессу образцах.

Таблица 7

Стрессовый тест Asp-изомеризации mAb, хроматография с сильным катионным обменом (SCX)

mAb	Стресс Да (+)/нет(-)	Доля aM (%)	Повышение доли aM после стрессового теста (%)
hC11a	-	45,1	-6,5
	+	38,6	
hC11b	-	45,2	-5,7
	+	39,5	
hC11c	-	40,3	-2,3
	+	38,1	
hC11d	-	41,3	-4,6
	+	36,7	
hC11e	-	44,4	-4,2
	+	40,2	
hC11f	-	43,5	-1,8
	+	41,7	
hC11g	-	44,5	-6,4
	+	38,0	
hC11h	-	43,2	-4,7
	+	38,5	
hC11i	-	44,1	-4,6
	+	39,5	
hC11j	-	43,7	-7,7
	+	36,0	
IMAB362	-	1,5	4,1
	+	5,6	

Настоящее изобретение также описано с помощью следующих вариантов осуществления:

1. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2.

2. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, содержащее 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.

3. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

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

в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 49, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 53;

h. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 50, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 54;

i. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 50, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51;

j. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 50, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52, или их версии со сконструированным Fc-доменом.

10. Антитело по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

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;

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

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

11. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, где антитело или его фрагмент представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии.

12. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, где антитело или его фрагмент является гуманизированным.

13. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-12, где антитело или его фрагмент не связывается с CLDN18.1.

14. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-13, где антитело или его фрагмент является менее восприимчивым к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAV362.

15. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, где антитело или его фрагмент метит в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз или по меньшей мере 20 раз больше опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2, относительно клеток здоровой ткани, экспрессирующих CLDN18.2, при измерении посредством проточной цитометрии.

16. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, где повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2, измеряют посредством проточной цитометрии или посредством иммуногистохимии.

17. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-16, где антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, экспрессирующимся на клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, со значением EC_{50} в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, по меньшей мере 1,5 раз, по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 2,5 раза выше, но не более чем 3 раза выше значения EC_{50} связывания IMAV362 с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High.

18. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 17, где связывание измеряют с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC).

19. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-18, где антитело или его фрагмент является выделенным.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19.

21. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 20.

22. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 20 или вектор по варианту осуществления 21.

23. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, нуклеиновая кислота по варианту осуществления 20, вектор по варианту осуществления 21 или клетка-хозяин по варианту осуществления 22 для применения в лечении индивидуума

a. страдающего,

b. имеющего риск развития, и/или

c. у которого диагностировано неопластическое заболевание.

24. Антитело или его фрагмент для применения по варианту осуществления 23, где неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких.

25. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент

(i) связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

(ii) конкурирует за связывание с антителом, содержащим последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51; и/или

(iii) конкурентно ингибирует связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51, с CLDN18.2.

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-м положении является H или Y

SEQ ID NO: 22 WINXYTGKPTYXXXFXG

X в 4-м положении является T или A;

X в 12-м положении является A или S;

X в 13-м положении является D или Q;

X в 14-м положении является D или K;

X в 16-м положении является K или Q

SEQ ID NO: 23 AVXYGYTMDA

X в 3-м положении является F или Y
 SEQ ID NO: 24 RXSEDIYSNXA
 X во 2-м положении является A или T;
 X в 10-м положении является L или F
 SEQ ID NO: 25 XXXRLQD
 X в 1-м положении является S или A;
 X во 2-м положении является V или I;
 X в 3-м положении является K или N
 SEQ ID NO: 26 LQGSXFPLT
 X в 5-м положении является K или N
 SEQ ID NO: 27, вариабельная область HC cC11-1
 QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMHWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGKPTYADD
 FKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQGTSVTVSS
 SEQ ID NO: 28, вариабельная область LC cC11-1
 DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSG
 TQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK
 SEQ ID NO: 29, вариабельная область HC cC11-2
 QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFTDYAMHWVKQGPQKGMKWMGWINAYTGKPTYADD
 FKGRFVLSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVYYGYTMDAWGQGTSVIVSS
 SEQ ID NO: 30, вариабельная область LC cC11-2
 DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQKSGKSPQLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSG
 TQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK
 SEQ ID NO: 31, вариабельная область HC cC11-3
 QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMYWVKQVPGKGLRWMGWINTYTGKPTYADD
 FKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQGTSVTVSS
 SEQ ID NO: 32, вариабельная область LC cC11-3
 DIQMTQSPASLSASLGETISIACRTSEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSG
 TQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK
 SEQ ID NO: 33, вариабельная область HC hCL1a
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 34, вариабельная область HC hCL1b, c и d
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 35, вариабельная область HC hCL1e
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 36, вариабельная область HC hCL1f и g
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 37, вариабельная область HC hCL1h, i и j
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 38, вариабельная область LC hCL1a, b, e и i
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 39, вариабельная область LC hCL1c и j
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 40, вариабельная область LC hCL1d и g
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRTSEDIYSNFAWYQQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 41, вариабельная область LC hCL1f и h
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGS
 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 42, вариабельная область HC hCL3a, b и c
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSVSSNYRWHWIRQPPGKGLEWIGYINIAGSTNYPNPSLKS
 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARNPSITRAMDAWGQGLVTVSS
 SEQ ID NO: 43, вариабельная область LC hCL3a
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYTNLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 44, вариабельная область LC hCL3b

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQTVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 45, вариабельная область LC hCL3c

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQSGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 46, полноразмерная HC hCL1a

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48, полноразмерная HC hCL1e

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49, полноразмерная HC hCL1f и g

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQ
 KFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSNFPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

SEQ ID NO: 52, полноразмерная LC hCL1c и j

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

SEQ ID NO: 53, полноразмерная LC hCL1d и g

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQQKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC

SEQ ID NO: 54, полноразмерная LC hCL1f и h

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGS

SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLOGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

SEQ ID NO: 55, полноразмерная HC IMAB362

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGGLEWIGNIYPSDSYTNYNQKF
KDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56, полноразмерная LC IMAB362

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGPV
DRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 57 DQWSTQDLYN

SEQ ID NO: 58 NNPVTAVFNYQ

SEQ ID NO: 59 STQDLYNNPVTAVF

SEQ ID NO: 60 TNFWMSTANMYTG

SEQ ID NO: 61 ALMIVGIVLGAIGLLV

SEQ ID NO: 62 RIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVS

SEQ ID NO: 63

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAPARRARRTKLGTGELGSPVWVNSADGRMDQWSTQDLYN
NPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQHSGGRSRRARTKTHLRGSE

SEQ ID NO: 64 MDQWSTQDLYNNPVT

SEQ ID NO: 65 LYNNPVTAVFNYQGL

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 gactacgcatgac

SEQ ID NO: 72

tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO: 73 gccgtctctacggatatacgtggacgcg

SEQ ID NO: 74

cagatccagctcgtcagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtcgaaggcagcggatatacgtcagcggactacg
cgatgcactgggtcaagcaagcgcggggaagggctgaagtgatgggtggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgactcaagggg
cgattcgtgtctcgtcgtgagcgcgagcagcgcgaacctgcaaatctcgaacctgaagaacgagacacggcagcgtactctgcgcggggccgtctt
ctacggatatacgtggacgcgtggggcaggggtaccagcgtgacggctcgcgac

SEQ ID NO: 75 cgggagcagcggacatctactgcaacctggcg

SEQ ID NO: 76 tccgtcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO: 77 ctgcaaggagcaactcccgtgacg

SEQ ID NO: 78

gacatccagatgacgcagagcccggcgtcgtgagcgcgagcctgggggagacgatctcgtcgcgtcccggcagcggagacatctactgcaacc
tggcgtggtatcaacagaagagcggggaagaccgcagctcgtgatcttctcgtcaagcggctgcaagacggcgtcccagccgattctcgggagcgggag
cgggacgcagctactcgtgaagatctcgggatgcagccggagcagggggactactctcctgcaaggagcaactcccgtgacgttcgggtcgggt
accaaactcgatcaaa

SEQ ID NO: 79

tggatcaacgcgtacacggggaagccgactacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO: 80 gccgtctactacggatatacgtggac

SEQ ID NO: 81

cagatccagctcgtcagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtcgaagacgagcggatatacgtcagcggactacg
cgatgcactgggtcaagcaggggcccagggaaagggatgaagtgatgggtggatcaacgcgtacacggggaagccgactacgcggacgactcaagggg
cgattcgtgctgagcctggagcgcgctcgcgagcgcgaacctgcaaatctcgaacctgaagaacgagacacggcagcgtactctgcgcggggccgtct
actacggatatacgtggacgcgtggggcaggggtaccagcgtgacgtcgcgac

SEQ ID NO: 82 cggacgagcagggacatctactgcaacttcgcg

SEQ ID NO: 83 tcagtcaaccggctgcaagac

SEQ ID NO: 84 ctgcaaggagcaagttcccgtgacg

SEQ ID NO: 85

gacatccagatgacgcagagcccggcagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgtcagtgccggacgagcggagacatctactgcaacc

tcgctggttccagcagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatctactcagtcaccggctgcaagacggcgtcccagccgattctcggggagcgggag
 cgggacgcagctactcgtgaagatctcgggatgcagccggaggacgaggggactacttctcctgcaagggagcaagttcccgtgacgttcgggagcggg
 accaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO: 86 gactacgcgatgtac

SEQ ID NO: 87

tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg

SEQ ID NO: 88

cgatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtcaagggagcggatatacgttcacggactacg
 cgatgtactgggtcaagcaagtccgggggaaaggctgctggtggtggatcaaacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg
 gattcgtgtctcgtggaggcagcgcgacggcgaacctgcaaatctcgaacctgaagaacgaggacacggcgacgtacttctgcgcggggccgtctc
 tacggatatacgtgacgcgtggggcaggggtaccagcgtgacggctcgcgagc

SEQ ID NO: 89 cggacgagcggagacatctactgaacctggcg

SEQ ID NO: 90 gcgatcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO: 91

gacatccagatgacgcagagcccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgtcgcgtccggacgagcaggacatctactcgaac
 ctggcgtgtatcaacagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatctcgcgatcaagcggctgcaagacggcgtcccagccgattctcggggagcggg
 agcgggacgcagctactcgtgaagatctcgggatgcagccggaggacgaggggactacttctcctgcaagggagcaagttcccgtgacgttcgggtcgg
 gtaccaactcgagatcaaa

SEQ ID NO: 92

tggatcaatacatacacggggaagccgacttgcgcaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 93 gcggtcttctacggatatacgtgatgcc

SEQ ID NO: 94

caggtccaactagtcaaaagcggggcgggaagtcaagaagcccggagcatccgtaaaagtcagctgcaagggcagcggatatacattacggactacgc
 gatgcactgggtcaggcaagcccctgggcaagggctcgaatggatgggatggatcaatacatcacggggaagccgacttgcgcaaaaattccaaggaaga
 gtcacaattacgcgggatacatccgatctaccgctacatggagctaaagctcgtcgggagcggagatacggcggctactattgcgccgagcggcttctacg
 gatatacgtgatgcctggggcaggggtaccctggtcaccgtctcgcgagc

SEQ ID NO: 95 agggcctccgaagacatctactccaacctggca

SEQ ID NO: 96 agcgtcaaaagactacaagat

SEQ ID NO: 97 ttgcaaggaaagcaattccccttgact

SEQ ID NO: 98

gacattcaaatgacgcaaaagcccacatcgtgagcgcacgtcgggtgggatagagtcaccataacatgagggcctccgaagacatctactccaacctgg
 catggtatcaacaaaaccggggaaggtccgaagctgctgatatgagtcgcaaaagactacaagatggagtfaccgagccgattttcgggaaagcgggagcggg
 acggattcacgctgaccatacaagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgctgcaaggaaagcaattccccttgacttccggcaaggtaccaaggtcg
 agatcaaaa

SEQ ID NO: 99 gattatgcaatgcac

SEQ ID NO: 100

tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 101 gctgtattctatggatatacaatggatgcc

SEQ ID NO: 102

caggtccaattagtcaaaagcggggcgggaagtcaagaagcccggggcggagcgtcaaaagtcctatgcaaaagcggcggatatacattacggattatgca
 atgcactgggtcaggcaagcaccggcaaaaggtggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaaggt
 cacgataacgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaaggtc
 gataacgagagacacgagcgcgagcaccgtaccctggtcaccgtctcgcgagc

SEQ ID NO: 103 cgaacgagcggagacatatactcaaaccttgca

SEQ ID NO: 104 gcgataaagaggctgcaagac

SEQ ID NO: 105 ttgcaaggctcaaaattcccctgaca

SEQ ID NO: 106

gacatcaaatgactcaaaagcccacatcgtatcggcatcggcggggatagagtcacgataacatgccgaacgagcggagacatatactcaaaccttg
 catggtatcaacaaaagccggggaagggcccgaagctactgatattcgcgataaagaggctgcaagacggagttccatcacgatttccgggatctggctcgggga
 ccgattttacgctgactatatacgtgcaaccgggaagatttgaacatactactgctgcaaggctccaaattcccctgacattcggacaaggtaccaaggtcga
 gatcaaaa

SEQ ID NO: 107 cggacgagcggagatatttcaactttgca

SEQ ID NO: 108 cagtcacatcggtacaagat

SEQ ID NO: 109

gacatcaaatgacgcaatcaccgagctcgtgagcgcacatctcggggaccgtgcacaatcacatgccggacgagcaggatatttcaactttgca
 atggtatcaacaaaaccgggcaaggtccgaaacttttgattatcagtcgaatggctacaagatggcgtcccagccgatfttgcgggagcggatcgggaaac
 gactttacgctgacgatatacgtactacaaccggaggactcgcgacttactgctacaagggagcaaaattcccgtgacattcggacaaggtaccaaggtcga
 gatcaaaa

SEQ ID NO: 110 gattacgcaatgtac

SEQ ID NO: 111

tggataaatacctatacgggaaagccaacatacggcccaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 112 gccgtctttatggatatacgtgatgccga

SEQ ID NO: 113

cagggtcaactggccaatcgggggctgaagtcaaaaagccgggggagcgtcaaaagtcagctgcaaagcatcgggatacacattcaggattacgca
atgfactgggtcaggcaagcaccggccaacgactggaatggatgggctggataaactatatacgggaaagccaacatacgcacaaaattccaagccgct
cacaataacggggacacgagcgcacggcttatatggaactatcatcgtcgatcggagacacggcgtctattatgcgacgcgccgtctttatggat
atacgaatggacgcagggggcagggtaccctggtcacggctcagc

SEQ ID NO: 114 gactacgcaatgcac

SEQ ID NO: 115

tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 116 gccgtctctatggatatacagatgatgct

SEQ ID NO: 117

cagggtcaatggccaagcggggcggagggtcaagaagccgggggagcgtcaaaagtcctcatgcaaaggcaagcggatatacattcaggactacgc
aatgactgggtccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatggatggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagcagca
gtcacgattacgggatactagcgcgagcaccgcataatgagctaaagctcgtcgatcggatatacaccgctgtatactactgcgcgagagccgtctctatgg
atatacgaatggatgctggggcagggtaccctggtcacggctcagc

SEQ ID NO: 118 cgagctcggagacatctatagcaactggct

SEQ ID NO: 119 agcgtcaaaagcctcaagac

SEQ ID NO: 120 ctacaaggctctaactccattgaca

SEQ ID NO: 121

gataccaaatgacgaatcaccatctagcctatcggcctctgtgggggaccgagtcaccatcacatgccgagctcggaggacatctatagcaactggct
tggtatcaacaaaagccgggaaagcaccaaagctgctgatatacgtcaaaagcctcaagacggagtcaccaagccgattctcgggctccggctccgggac
ggattttacgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactatgctcaaaagccttaactccattgacattgggcaaggtaccaaggtcag
atcaaa

SEQ ID NO: 122 gactacgctatgtat

SEQ ID NO: 123

tggattaatgcctacaccggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 124 gcggtctactatggatatacagatggacgca

SEQ ID NO: 125

cagggtcaactggccaatcgggagcgggaagcaagaagccgggagcaccgcaaaagtcctcgtgcaaggcatcggatatacacattcaccgactacgctat
gattgggtccggcaagccccggacaacggctggaatggatggatggattaatgcctacaccggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaaggaaggtcac
gattacggggacacgagcgcctcaaccgcatacggagctatcagcctcggagcggagcaccggtctactactgcgcgggcggctctactatggat
atacgaatggacgcagggggcagggtaccctggtcacggctcagc

SEQ ID NO: 126 WINXYTGKPTYXQKFQG

X в 4-м положении является T или A;

X в 12-м положении является A или S

[CDR2 HC только для hC11x, а не химерных клонов сC11-1,2,3]

SEQ ID NO: 127

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
T YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [константный домен легкой цепи - CL]

SEQ ID NO: 128

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [константный
домен тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 129

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [мутация
L234A/L235A в константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 130

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [мутация
L236A/L236A/P329G в константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 131 RLPQTGG [метка сортазы]

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

SEQ ID NO: 133 CLDN18.2

MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRG
 YFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGV
 SVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFVGVWVAGGLTLIGGVMCCIACRGLAP
 EETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV

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.
- 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.
- Chang, Z. L., and Y. Y. Chen. 2017. 'CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond', *Trends Mol Med*, 23: 430-50.
- 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.
- 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. Kroppshofer, 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.
- 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.).
- 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-mAb™ 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 FcγRIIb 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 FcγRIIIa 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.
- Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. 'Optimization of antibody binding to FcγRIIIa 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. Tuillon, C. T. Rankin, H. Li, S. Burke, L. Huang, S. Vijn, 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 Fcγ receptors', *Cancer Res*, 67: 8882-90.
- 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. Krivoshik, 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.

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
WO2000/015659
WO2004/047863
WO2005/113587
WO2007/059997
WO2008/145338
WO2013/167259
WO2013/174509
WO2014/075788
WO2014/127906
WO2016/166122
WO2016/165762
WO2018/006882
WO2019/173420
WO2019/175617
WO2019/219089

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, связывающиеся с клаудином 18.2 (CLDN18.2), где антитело или его фрагмент демонстрируют повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2, и содержат 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.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, содержащее:

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;

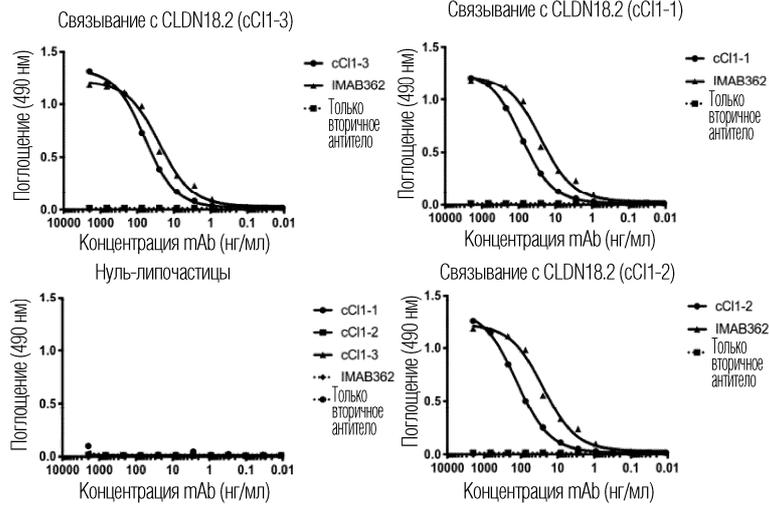
д. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

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;

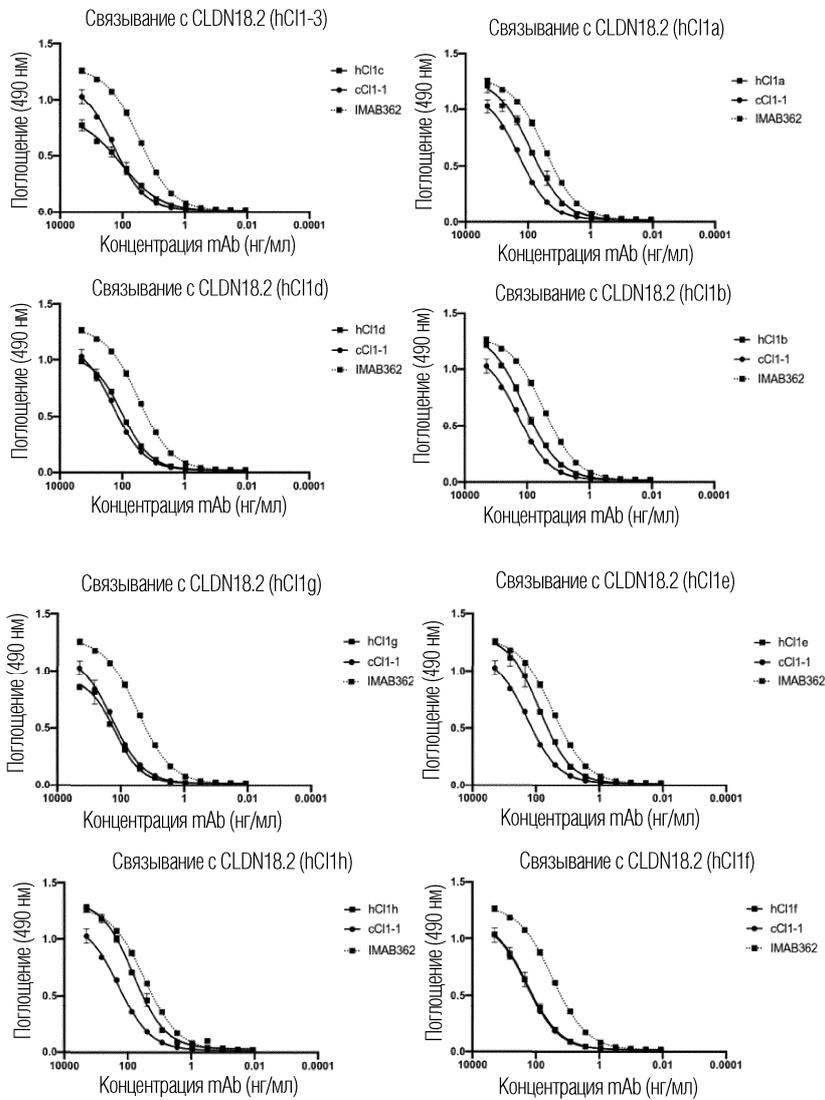
ж. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

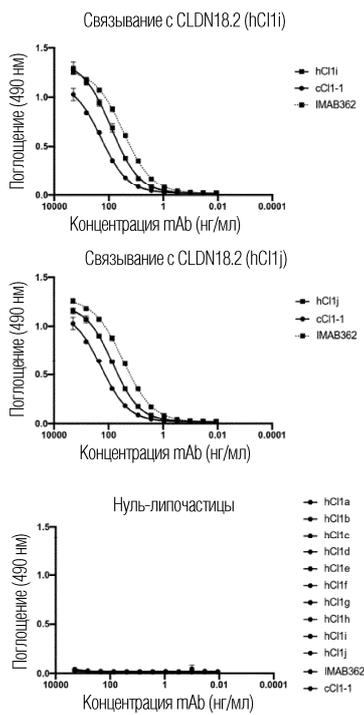
з. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

- п. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;
- о. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;
- р. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;
- q. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;
- г. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;
- с. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51; или
- т. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52.
7. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его фрагмент представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH₂, F(ab')₂, scFvCH₃, Fab, VL, VH, scFv4, scFv₃, scFv₂, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии.
8. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-7, где антитело или его фрагмент является гуманизированным.
9. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-8, где антитело или его фрагмент, не связывается с CLDN18.1.
10. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или его фрагмент является выделенным.
11. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-10, где антитело или его фрагмент является менее склонным к посттрансляционному дезамидированию, чем антитело с тяжелой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 55 и с легкой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 56 (IMAB362).
12. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11, где повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2, измеряют посредством проточной цитометрии или посредством иммуногистохимии.
13. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11, где антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, со значением EC₅₀ в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 2,5 раза выше, но не более чем 3 раза выше значения EC₅₀ связывания IMAB362 с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, необязательно, где связывание измеряют с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC).
14. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-13.
15. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.14.
16. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.14 или вектор по п.15.
17. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-13, нуклеиновой кислоты по п.14, вектора по п.15 или клетки-хозяина по п.16 для лечения индивидуума
- страдающего неопластическим заболеванием,
 - имеющего риск развития неопластического заболевания, и/или
 - у которого диагностировано неопластическое заболевание.
18. Применение по п.17, где неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких.

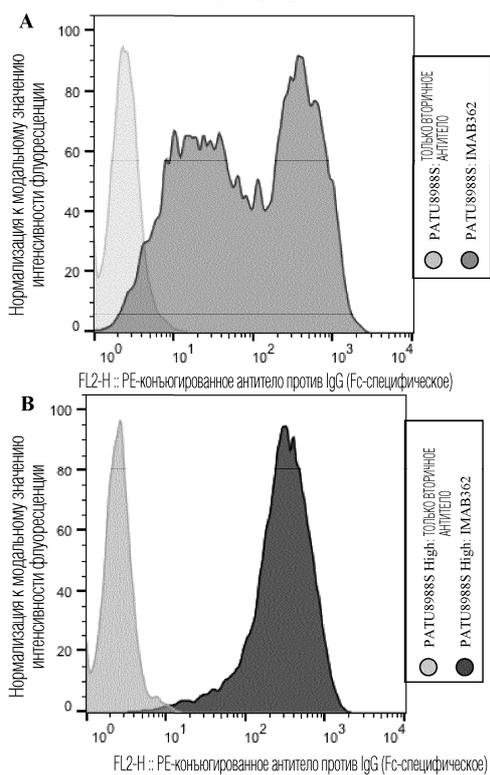


Фиг. 1А

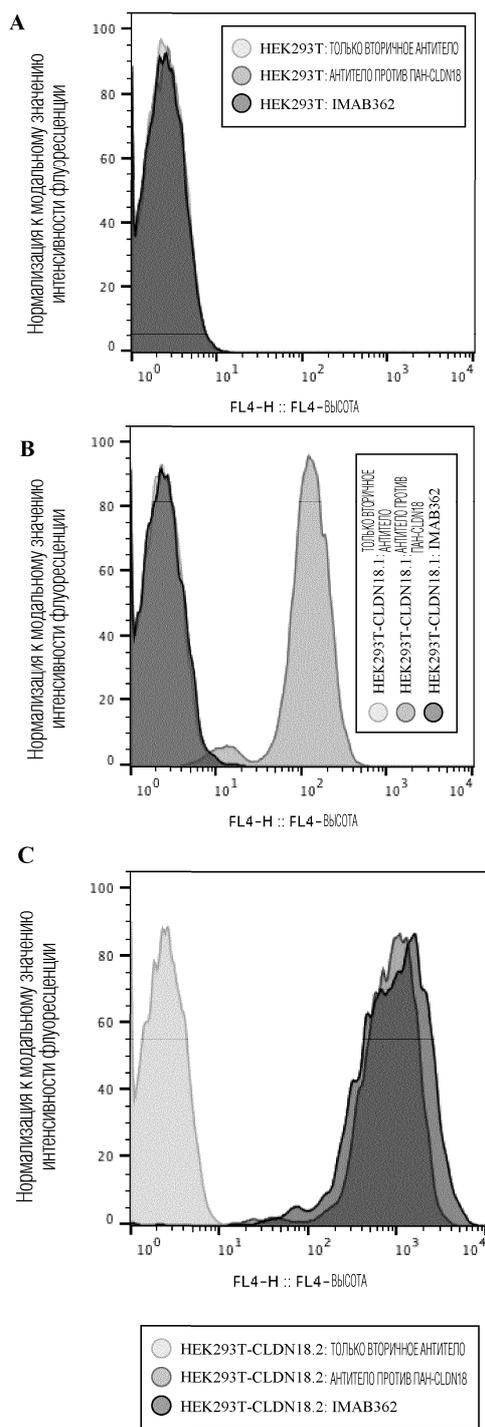




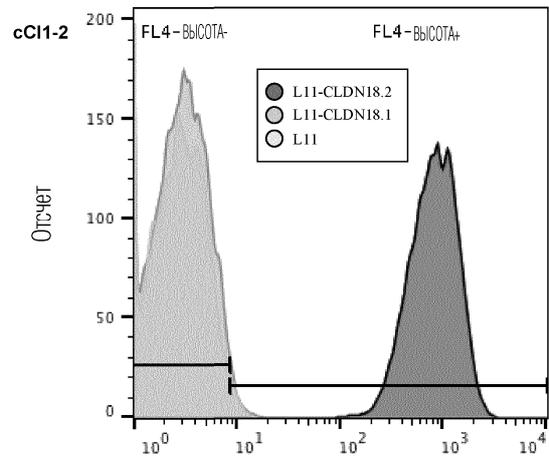
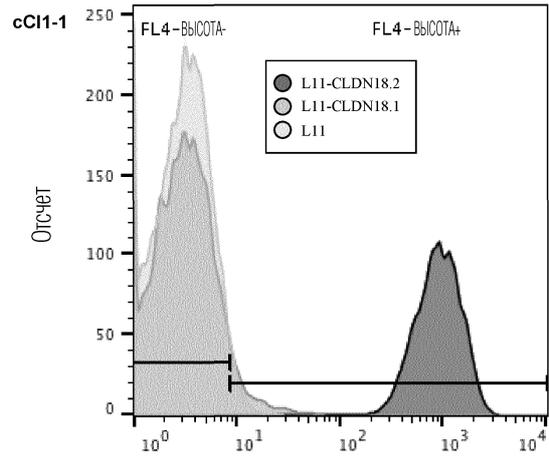
Фиг. 1В

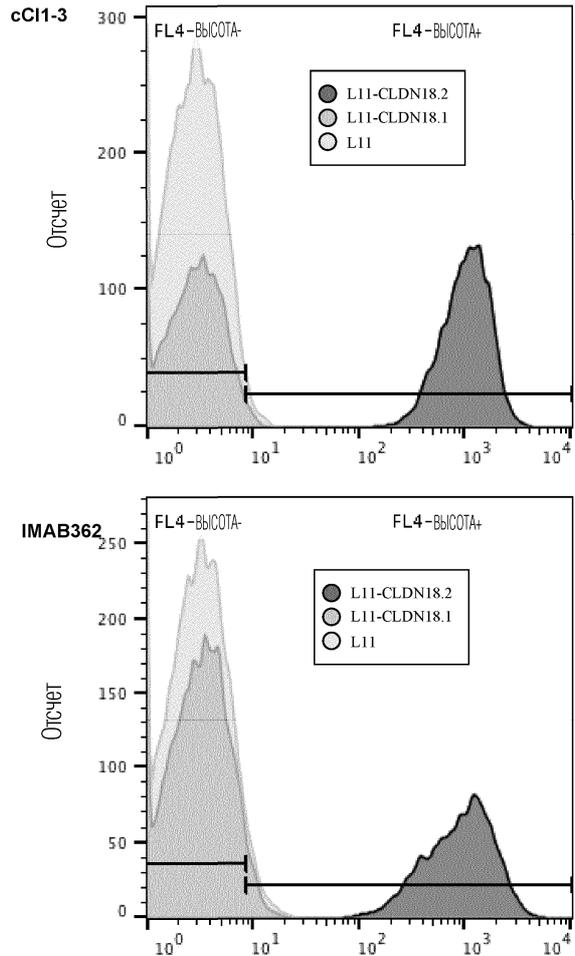


Фиг. 2

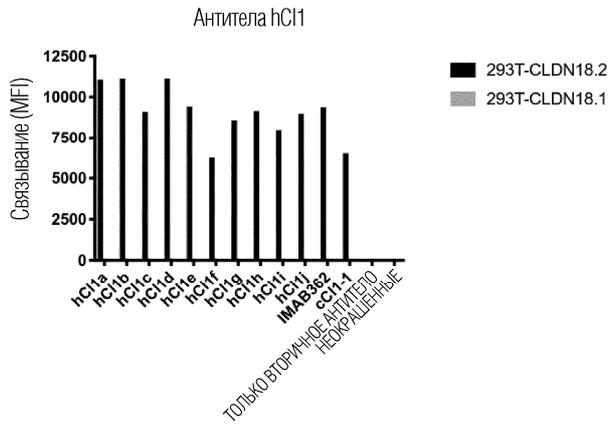


Фиг. 3

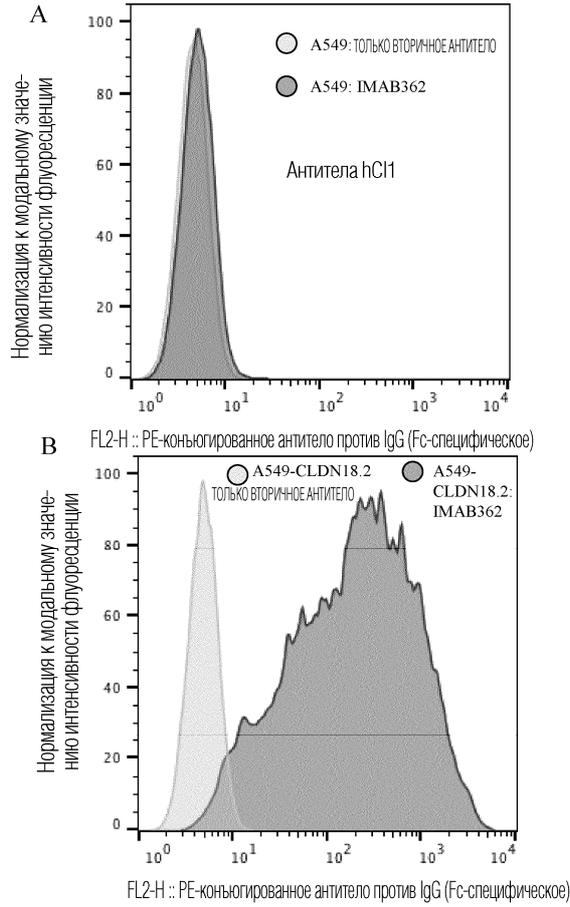




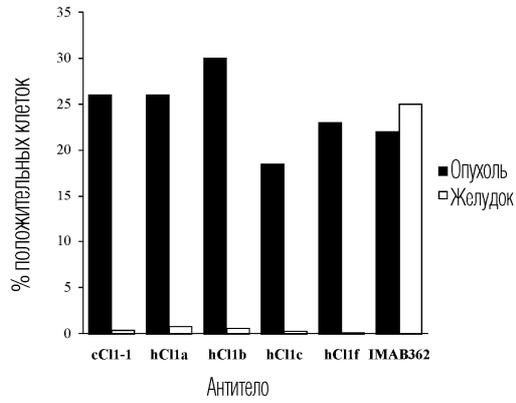
Фиг. 4



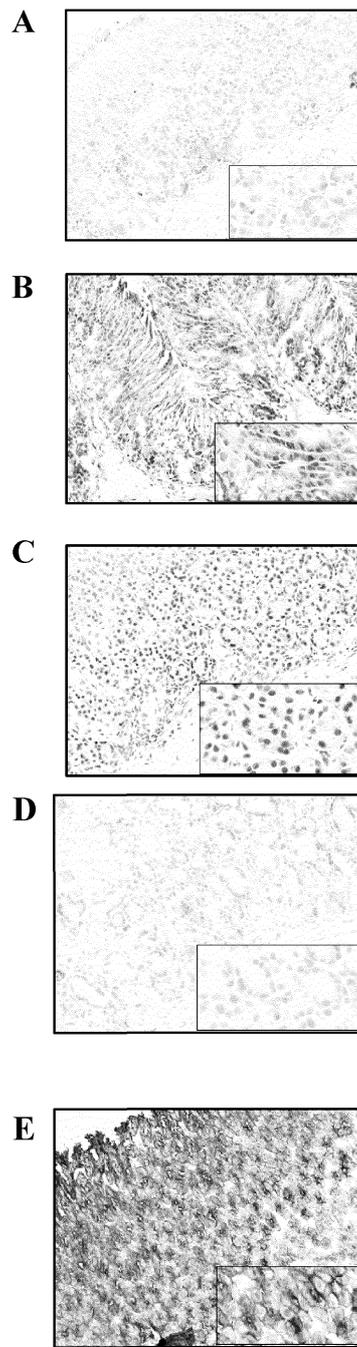
Фиг. 5



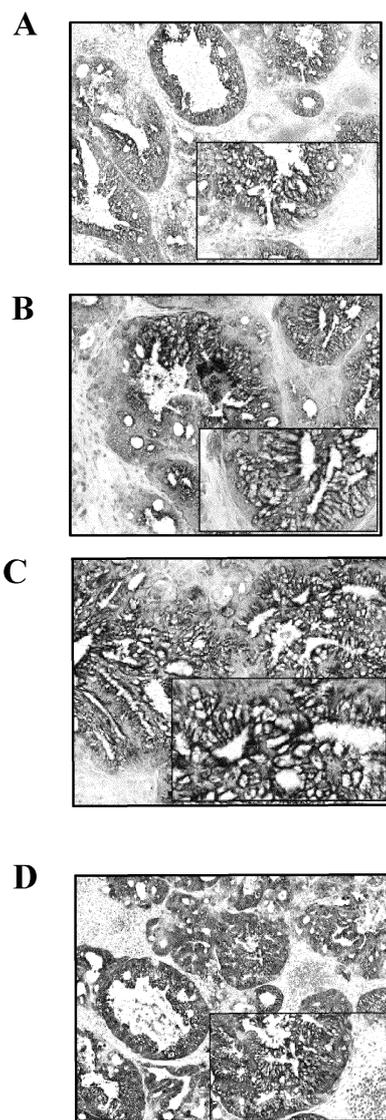
Фиг. 6



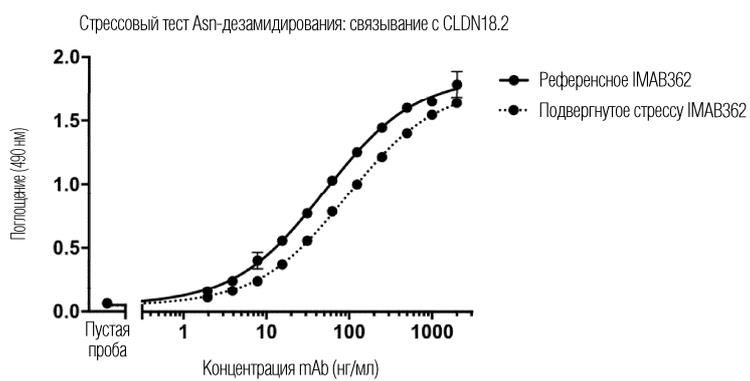
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2