

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047699**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.08.28**

(21) Номер заявки  
**202291388**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.11.05**

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, НАЦЕЛЕННЫЕ НА КЛАУДИН 18.2**

---

(31) PCT/CN2019/115760

(32) 2019.11.05

(33) CN

(43) 2022.11.07

(86) PCT/CN2020/126780

(87) WO 2021/088927 2021.05.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЛАНОВА МЕДСИНЗ ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:  
Ли Жуньшэн (CN)

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

(56) WO-A1-2019219089  
WO-A1-2016165762  
WO-A1-2018006882  
EP-A2-2311877  
WO-A1-2019170147  
WO-A1-2019174617  
WO-A1-2016166122  
WO-A1-2013167153

---

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим молекулу лекарственного средства, присоединенную к антителу или к его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа. Антитело или его фрагмент связываются с петлей  $\beta$ 3- $\beta$ 4 (остатки 45-63 SEQ ID NO: 30, NYQGLWRSCVRESSGFTEC) и с цепью  $\beta$ 5 (остатки 169-172 SEQ ID NO: 30, YTFG) CLDN18.2.

**047699**

**B1**

**047699**  
**B1**

### Предпосылки создания изобретения

Клаудины, такие как клаудин 18.2, рассматриваются как перспективные мишени для иммунотерапии рака. Клаудины представляют собой семейство белков, которые образуют важные компоненты плотных клеточных контактов. Они создают парацеллюлярный барьер, который регулирует поток молекул между клетками. Белки имеют N-конец и C-конец в цитоплазме. Различные клаудины экспрессируются в разных тканях, и их измененная функция приводит к развитию рака соответствующих тканей. Клаудин-1 экспрессируется при раке толстой кишки, клаудин-18 экспрессируется при раке желудка, а клаудин-10 экспрессируется при гепатоцеллюлярной карциноме.

Клаудин-18 имеет две изоформы, изоформу 1 и изоформу 2. Изоформа 2 (Клаудин 18.2 или CLDN18.2) является высокоселективным маркером клеточной линии дифференцировки. Экспрессия клаудина 18.2 в нормальных тканях строго ограничена дифференцированными эпителиальными клетками слизистой оболочки желудка, но отсутствует в области стволовых клеток желудка. Клаудин 18.2 сохраняется при злокачественной трансформации и экспрессируется в большинстве случаев первичного рака желудка и его метастазов. Эктопическая активация клаудина 18.2 также часто обнаруживается в опухолях поджелудочной железы, пищевода, яичников и легких. Эти данные свидетельствуют о том, что CLDN18.2 имеет сильно ограниченный паттерн экспрессии в нормальных тканях с частой эктопической активацией при различных видах рака у человека.

### Сущность изобретения

В настоящем изобретении раскрываются антитела против клаудина 18.2, которые селективно связываются с клаудином 18.2 дикого типа и с широко распространенным мутантом M149L и не связываются с другими изоформами клаудина 18, такими как клаудин 18.1. Удивительным и неожиданным открытием авторов настоящего изобретения является то, что эти антитела обладают высокой эффективностью в индуцировании опосредованной рецептором интернализации антител, в частности, по сравнению с IMAB362 (клаудиксимабом), то есть, главным антителом против клаудина 18.2, находящимся на стадии клинической разработки. Следовательно, при конъюгировании с молекулой лекарственного средства, эти антитела способны эффективно доставлять лекарственное средство в клетки-мишени, такие как раковые клетки, сверхэкспрессирующие белок клаудин 18.2.

Значительно повышенная способность индуцировать опосредованную рецептором интернализацию антител, описанных в настоящем изобретении, может ассоциироваться с механизмами, посредством которых эти антитела связываются с белком клаудином 18.2. Как показано в примере 14 и проиллюстрировано на фиг. 20, аминокислотные остатки на белке клаудине 18.2, которые играют важную роль в связывании с антителами, включают остатки, которые играют важную роль в стабилизации конформации внеклеточных петель (например, W30, L49, W50, C53, C63 и R80). Еще более важно то, что остатки, которые участвуют в связывании с антителами, включают N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62, расположенные между цепями  $\beta 3$  и  $\beta 4$  первой внеклеточной петли, а также Y169 и G172, которые находятся в  $\beta 5$  второй внеклеточной петли. И наоборот, считается, что известные антитела против клаудина 18.2 связываются только с одной из внеклеточных петель.

В соответствии с одним своим вариантом, настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему молекулу лекарственного средства, ковалентно присоединенную к антителу или к его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 дикого типа (CLDN18.2), где антитело или его фрагмент связывается с петлей  $\beta 3$ - $\beta 4$  и цепью  $\beta 5$  CLDN18.2. Петля  $\beta 3$ - $\beta 4$  состоит из остатков 45-63 SEQ ID NO: 30 (NYQGLWRSCVRESSGFTEC), а цепь  $\beta 5$  состоит из остатков 169-172 SEQ ID NO: 30 (YTFG).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, соотношение количества фрагментов лекарственного средства к количеству антитела или фрагмента составляет от 1:1 до 20:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение составляет от 2:1 до 10:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение составляет от 2:1 до 6:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение составляет приблизительно 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1 или 5:1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент не связывается с  $\beta 1$  и  $\beta 2$  или связывается с  $\beta 1$  или  $\beta 2$  с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз ниже, чем аффинность связывания с петлей  $\beta 3$ - $\beta 4$  или с цепью  $\beta 5$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент не связывается с белком CLDN18.1 или связывается с CLDN18.1 с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз ниже, чем аффинность связывания с CLDN18.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с мутантом M149L CLDN18.2 с аффинностью, составляющей по меньшей мере 1% от аффинности к белку CLDN18.2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связывается по меньшей мере с аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62; и по меньшей мере с аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из Y169 и G172 SEQ ID NO: 30.

Фрагмент лекарственного средства может представлять собой цитотоксический или цитостатиче-

ский агент, иммунодепрессант, радиоизотоп, токсин или т.п. Фрагмент лекарственного средства, после его высвобождения в раковую клетку, может ингибировать размножение раковой клетки или вызывать апоптоз раковой клетки.

Примеры фрагментов лекарственного средства выбраны из группы, состоящей из DM1 (майтанзина, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N2'-диацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзина), mc-MMAD (6-малеимидокапроил-монометилауристатина-D или N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-2-метокси-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[[[(1S)-2-фенил-1-(2-тиазолил)этил]амино]пропил]-1-пирролидинил]-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-(9Cl)-L-валинамида), mc-MMAF (малеимидокапроил-монометилауристатина F или N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-N-метил-L-валил-L-валил-(3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламино)гептаноил-( $\alpha$ R, $\beta$ R,2S)- $\beta$ -метокси- $\alpha$ -метил-2-пирролидинпропаноил-L-фенилаланина) и mc-Val-Cit-PAVA-MMAE (6-малеимидокапроил-ValcCit;- (п-аминобензилоксикарбонил)-монометилауристатина E или N-[[[4-[[N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-L-валил-1H-(аминокарбонил)-L-орнитил]амино]фенил]метокси]карбонил]-N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1R,2S)-2-гидрокси-1-метил-2-фенилэтил]амино]-1-метокси-2-метил-3-оксопропил]-1-пирролил инил]-2-метокси-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-L-валинамида). DM1 является производным мйтанзина, то есть, ингибитора тубулина, тогда как MMAD, MMAE и MMAF являются производными ауристатина.

Настоящее изобретение также относится к способам и к применению для лечения заболеваний и состояний. В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту конъюгата антитело-лекарственное средство согласно изобретению.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что мышьяная сыворотка от всех мышей после ДНК-иммунизации имеет высокий уровень титра реакции с клетками HEK293, трансфицированными CLD 18A2, как было определено с помощью проточной цитометрии, где CLD 18A1 использовали в качестве негативного контроля.

На фиг. 2 показано, что супернатанты гибридомы могут связываться с клетками HEK293, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью ELISA или проточной цитометрии клеток.

На фиг. 3 показано, что очищенные мышьяные антитела могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub> по сравнению с антителом, используемым в качестве позитивного контроля.

На фиг. 4 показано, что очищенные мышьяные антитела могут связываться с клетками SU620, эндогенно экспрессирующими человеческий CLDN18.2, несущий мутацию M149L, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub>, в то время как эталонное антитело не обладало такой функцией.

На фиг. 5 показано, что очищенные мышьяные антитела могут связываться с клетками HEK293, трансфицированными мышьяным CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub>.

На фиг. 6 показано, что очищенные мышьяные антитела могут связываться с клетками HEK293, трансфицированными CLDN18.2 собакоподобных обезьян, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub>.

На фиг. 7 показано, что очищенные мышьяные антитела могут связываться с клетками HEK293, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub>.

На фиг. 8 показано, что химерные антитела могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub> по сравнению с антителом, используемым в качестве позитивного контроля.

На фиг. 9 показано, что химерные антитела не могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.1 как было определено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 10 показано, что гуманизованные антитела могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub> по сравнению с антителом, используемым в качестве позитивного контроля.

На фиг. 11 показано, что гуманизованные антитела не могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.1 как было определено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 12 показано, что гуманизованные антитела с мутацией CDR могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой EC<sub>50</sub> по сравнению с антителом, используемым в качестве позитивного контроля.

На фиг. 13 показано, что гуманизованные антитела с мутацией CDR не могут связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.1, как было определено с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 14 показано, что варианты без риска модификации обладали сильным связыванием с CLDN18.2 клеточной поверхности.

На фиг. 15 показано, что определенные мутации CLDN18.2 оказывают значительное влияние на связывание указанных антител с клетками HEK293, трансфицированными этими мутантами, что позволяет предположить, что эти аминокислотные остатки составляют по меньшей мере часть эпитопа.

На фиг. 16 показано, что антитела 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 лучше связывались с клетками CHO-K1 как с высоким, так и с низким содержанием клаудина 18.2 по сравнению с 175D10.

На фиг. 17 показаны результаты тестирования на активную ADCC для 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 с использованием антитела 175D10 в качестве эталона.

На фиг. 18 показано, что варианты S239D/I332E 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 превосходили аналог 175D10 в анализах на ADCC.

На фиг. 19 показано, что 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 также обладали лучшим ADCP, чем 175D10.

На фиг. 20 проиллюстрированы трехмерная структура и структуры мотивов белков клаудина.

На фиг. 21 показаны результаты интернализации протестированных химерных антител по сравнению с эталонным антителом IMAB362 на клетках CHO, экспрессирующих клаудин 18.2.

На фиг. 22 показаны результаты интернализации протестированных гуманизованных антител по сравнению с эталонным антителом IMAB362 на клетках CHO, экспрессирующих клаудин 18.2.

На фиг. 23 показаны результаты интернализации протестированных гуманизованных антител по сравнению с эталонным антителом IMAB362 на клетках MKN45, экспрессирующих клаудин 18.2.

На фиг. 24 показана аффинность связывания антител и их конъюгатов с лекарственными средствами.

На фиг. 25A-C показана клеточная токсичность тестируемых конъюгатов антитело-ММАЕ при интернализации в трансфектанты DAN-G, NUGC или SCG-7901.

На фиг. 26 показана клеточная токсичность тестируемых конъюгатов антитело-ММАЕ после интернализации в SNU620, эндогенно экспрессирующие человеческий клаудин 18.2.

На фиг. 27 приводится сравнение конъюгата антитело-лекарственное средство с одним антителом в отношении снижения роста опухоли у подопытных животных.

На фиг. 28 показаны средние или отдельные эффекты уменьшения опухоли в случае использования конъюгата антитело-лекарственное средство.

#### Подробное описание

Определения.

Следует отметить, что артикли "a" или "an" относятся к одному или более объектам, например, "an antibody" означает одно или более антител. Таким образом, "a" (или "an"), "один или более" и "по меньшей мере один" могут употребляться здесь как синонимы.

Используемый здесь термин "полипептид" охватывает как "один полипептид", так и "несколько полипептидов" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" означает любую цепь или цепи из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, определение "полипептид" охватывает пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "цепь аминокислот" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, и термин "полипептид" может использоваться вместо любого из этих терминов или является их синонимом. Термин "полипептид" также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию неприродными аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника, или он может быть получен с применением рекомбинантной технологии, но он необязательно транскрибируется из указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, включая химический синтез.

Термин "выделенный", если он используется здесь в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. Используемый здесь термин "выделенный" также относится к нуклеиновой кислоте или к пептиду, которые по существу не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды при их получении методами рекомбинантных ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Кроме того, подразумевается, что "выделенная нуклеиновая кислота" включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не могут быть обнаружены в природе. Термин "выделенный" также используется здесь для обозначения клеток или полипептидов, которые выделены из других клеточных белков или тканей. Термин "выделенный полипептид" охватывает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

Используемый здесь термин "рекомбинантный", если он относится к полипептидам или полинуклеотидам, означает форму полипептида или полинуклеотида, которая не существует в природе, и его неограничивающим примером может служить соединение, которое может быть получено путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, которые обычно не встречаются в природе вместе.

Термины "гомология", или "идентичность", или "сходство" относятся к сходству последовательно-

стей двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положений в каждой последовательности, которые могут быть выровнены для сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или аминокислотой, то такие молекулы считаются гомологичными в этом положении. Степень гомологии между последовательностями зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, которые являются общими для этих последовательностей. "Неродственная" или "негомологичная" последовательность имеет менее 40% идентичности, а предпочтительно, менее 25% идентичности, с одной из последовательностей согласно изобретению.

Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеют определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) "идентичности последовательности" с другой последовательностью, и это означает, что при выравнивании, такой процент оснований (или аминокислот) является одинаковым при сравнении двух последовательностей. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с использованием компьютерных программ, известных специалистам в данной области, например программ, описанных Ausubel et al., eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно, для выравнивания используются параметры по умолчанию. Одной из программ выравнивания является BLAST, где используются параметры по умолчанию. В частности, в программах BLASTN и BLASTP используют следующие параметры по умолчанию: Генетический код=стандартный; фильтр=нет; цепь=обе; отсечка=60; ожидание=10; Матрица=BLOSUM62; Описания=50 последовательностей; сортировка=ВЫСОКАЯ ОЦЕНКА; Базы данных=неизбыточные, GenBank+EMBL+DBJ+PDB+трансляции CDS GenBank+SwissProtein+SPupdate+PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, имеющие указанный выше процент гомологии и кодирующие полипептид, обладающий такой же или подобной биологической активностью.

Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или эквивалентный полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность с определенной степенью гомологии или идентичности нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты или ее комплемента. При этом, предполагается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность с определенной степенью гомологии с этой последовательностью или с ее комплементом. В одном аспекте изобретения, гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или с ее комплементом. Аналогичным образом, термин "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, имеющему определенную степень гомологии или идентичности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида. В некоторых аспектах изобретения, идентичность последовательностей составляет по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах изобретения, эквивалентный полипептид или полинуклеотид имеет одну, две, три, четыре или пять добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах изобретения, эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывания с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

Реакции гибридизации могут быть проведены в различных условиях "жесткости". Обычно, реакцию гибридизации в условиях низкой жесткости проводят при температуре приблизительно 40°C приблизительно в 10-кратном SSC или в растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию умеренной жесткости обычно проводят при температуре приблизительно 50°C в среде, содержащей приблизительно 6xSSC, а реакцию гибридизации высокой жесткости обычно проводят при температуре приблизительно 60°C в среде, содержащей приблизительно 1xSSC. Реакции гибридизации могут быть также проведены в "физиологических условиях", хорошо известных специалистам в данной области. Неограничивающим примером физиологического состояния является температура, ионная сила, pH и концентрация  $Mg^{2+}$ , которые обычно наблюдаются в клетке.

Полинуклеотид состоит из определенной последовательности из четырех нуклеотидных оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G); тимина (T); и урацила (U) вместо тимина, если полинуклеотид представляет собой РНК. Таким образом, термин "полинуклеотидная последовательность" представляет собой алфавитное представление молекулы полинуклеотида. Такое алфавитное представление может быть введено в базы данных на компьютере, имеющем центральный процессор, и могут быть использованы для приложений биоинформатики, таких как функциональная геномика и поиск гомологии. Термин "полиморфизм" относится к наличию более чем одной формы гена или его части. Часть гена, которая имеет по меньшей мере две различные формы, то есть, две различные нуклеотидные последовательности, называется "полиморфной областью гена". Полиморфная область может представлять собой один нуклеотид, идентичность которого отличается в различных аллелях.

Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" используются как синонимы и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую известную или неизвестную функцию. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов:

ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, метка EST или SAGE), экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК, дцРНК, киРНК, миРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК с любой последовательностью, выделенная РНК с любой последовательностью, зонды и праймеры нуклеиновых кислот. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Модификации нуклеотидной структуры, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может прерываться не-нуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, посредством конъюгирования с компонентом для мечения. Этот термин также относится как к двухцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если это не оговорено особо, и не указано иное, то любой вариант осуществления изобретения, который представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, о которых известно или предполагается, что они составляют двухцепочечную форму.

Термин "кодировать", применительно к полинуклеотидам, относится к полинуклеотиду, который, как считается, "кодирует" полипептид, если в его нативном состоянии или при манипуляциях с применением методов, хорошо известных специалистам в данной области, он может быть транскрибирован и/или транслирован с получением мРНК полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь является компонентом такой нуклеиновой кислоты, и кодирующая последовательность может происходить от этой последовательности.

Используемый здесь термин "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой полноразмерное антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или его одиночную цепь. Таким образом, термин "антитело" включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая включает по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примерами являются, но не ограничиваются ими, комплементарность-определяющая область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лигандсвязывающая часть, варибельная область тяжелой или легкой цепи, константная область тяжелой или легкой цепи, каркасная область (FR) или любая ее часть, или по меньшей мере одна часть связывающего белка.

Используемые здесь термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" означают часть антитела, такую как F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, оптические изомеры и диантитела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или генетически сконструированный белок, который действует как антитело, посредством связывания со специфическим антигеном с образованием комплекса.

Термин "Одноцепочечный варибельный фрагмент" или "scFv" относится к слитому белку варибельных областей тяжелой (V<sub>H</sub>) и легкой (V<sub>L</sub>) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах изобретения, области соединены коротким линкерным пептидом, состоящим приблизительно из 10-25 аминокислот. Линкер может быть обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может либо соединять N-конец V<sub>H</sub> с C-концом V<sub>L</sub>, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы ScFv известны специалистам в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019.

Термин "антитело" охватывает различные полипептиды широкого класса, которые могут отличаться по биохимическому составу. Специалистам в данной области известно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) с некоторыми подклассами (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgG<sub>5</sub> и т.п., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию.

Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области с учетом раскрытия настоящего настоящего изобретения, и, соответственно, входят в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов, несомненно, входят в объем настоящего изобретения, и последующее обсуждение будет в основном касаться класса молекул иммуноглобулина IgG. Что касается IgG, то стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", в которой легкие цепи обрамляют тяжелые цепи, начинающиеся с устья "Y", и продолжающиеся вплоть до варибельной области.

Антителами, антигенсвязывающими полипептидами, их вариантами или производными согласно изобретению являются, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, мультиспецифи-

ческие, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, продуцируемые с использованием библиотеки для экспрессии Fab и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела против LIGHT-антител, раскрытые в настоящем изобретении). Молекулы иммуноглобулина или антитела согласно изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>) или подклассу молекулы иммуноглобулина.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Тяжелые цепи каждого класса могут быть связаны с легкой цепью каппа или лямбда. Обычно, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины продуцируются гибридами, В-клетками или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи, аминокислотные последовательности простираются от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

Легкие и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используются в зависимости от их функций. В этом отношении следует отметить, что вариабельные домены как легкой (V<sub>K</sub>), так и тяжелой (V<sub>H</sub>) цепей определяют распознавание и специфичность антигена. И наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) сообщают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецептором Fc, связывание комплемента и т.п. В соответствии с номенклатурой, нумерация доменов константной области увеличивается по мере того, как они становятся более удаленными от антигенсвязывающего сайта или amino-конца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, а C-концевая часть представляет собой константную область; и домены СН3 и СК фактически включают карбокси-концы тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указывалось выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связываться с ними. То есть, домен VK и домен VH или подмножество комплементарность-определяющих областей (CDR) антитела объединены с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный сайт связывания с антигеном. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания с антигеном, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, сайт связывания с антигеном определяется тремя CDR на каждой из цепей V<sub>H</sub> и V<sub>K</sub> (то есть, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в случае некоторых молекул иммуноглобулина, происходящих от животных семейства верблюжьих или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюда, полноразмерная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей и не содержит легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993).

В природных антителах, шесть "комплементарность-определяющих областей" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие, не-смежные аминокислотные последовательности, которые специфически расположены так, что они образуют антигенсвязывающий домен, если антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные области в значительной степени принимают  $\beta$ -складчатую конформацию, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях, составляют часть  $\beta$ -складчатой структуры. Таким образом, каркасные области образуют остов, который обеспечивает позиционирование CDR в правильной ориентации за счет межцепевых нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный позиционированными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его родственным эпитопом. Аминокислоты, содержащие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть легко идентифицированы для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области, поскольку они были точно определены (см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); and Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

В случае, если существует два или более определений термина, который используется и/или применяется в данной области, то предполагается, что определение термина, используемого в настоящем изобретении, включает все указанные значения, если это не оговорено особо. Конкретным примером является использование термина "комплементарность-определяющая область" ("CDR") для описания не-смежных сайтов связывания с антигеном, присутствующих в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область описана Кэбатом (Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Чотия (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)), где указанные публикации в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. Определения CDR по Кэбату и Чотия включают перекрывающиеся или подмноже-

ства аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, предполагается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема этого термина в том виде как он определен и используется в настоящем изобретении. Соответствующие аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из цитированных выше ссылок, представлены ниже в таблице для сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретный CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут легко определить, какие остатки входят в конкретную CDR, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

	По Кэбату	По Чотия
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Кэбат и др. также определили систему нумерации последовательностей вариабельных доменов, применимую к любому антителу. Специалист в данной области может однозначно присвоить эту систему "нумерации по Кэбату" любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Используемый здесь термин "нумерация по Кэбату" относится к системе нумерации, установленной Кэбатом и др. (Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)).

В дополнение к приведенной выше таблице, согласно системе нумерации по Кэбату, области CDR определены следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с аминокислоты 31 (то есть, приблизительно через 9 остатков после первого цистеинового остатка), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается следующим триптофановым остатком. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после конца CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается следующим аргининовым или лизиновым остатком. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего аминокислотного остатка после конца CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается последовательностью W-G-X-G, где X означает любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с остатка 24 (то есть, после остатка цистеина), включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем триптофановом остатке. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после конца CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка после конца CDR-L2 (то есть, после цистеинового остатка), включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается последовательностью F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

Описанные здесь антитела могут происходить от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно, антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В другом варианте осуществления изобретения, вариабельная область может иметь "кондриктоидное" происхождение (например, она может происходить от акул).

Используемый здесь термин "константная область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие от тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, включает по меньшей мере один из следующих доменов: домен CH1, шарнирный домен (например, верхнюю, среднюю/или нижнюю шарнирную область), домен CH2, домен CH3 или их вариант или фрагмент. Так, например, антигенсвязывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может включать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. В другом варианте осуществления изобретения, полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, включающую домен CH3. Кроме того, антитело для применения согласно изобретению может не иметь по меньшей мере части домена CH2 (например, всего домена CH2 или его части). Как указано выше, специалисту в данной области должно быть очевидно, что константные области тяжелой цепи могут быть модифицированы так, чтобы они по своей аминокислотной последовательности отличались от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем изобретении, может быть получена из различных молекул иммуноглобулина. Так, например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, происходящий от молекулы IgG<sub>1</sub>, и шарнирную область, про-



исходящую от молекулы IgG<sub>3</sub>. В другом примере, константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG<sub>1</sub> и частично из молекулы IgG<sub>3</sub>. В другом примере, часть тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, происходящую частично от молекулы IgG<sub>1</sub> и частично от молекулы IgG<sub>4</sub>.

Используемый здесь термин "константная область легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие от легкой цепи антитела. Предпочтительно, константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один константный домен каппа или константный домен лямбда.

"Пара легкая цепь-тяжелая цепь" относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей иммуноглобулинов различных классов хорошо известны специалистам. Используемый здесь термин "домен VH" включает аминоконцевой варибельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен CH1" включает первый (самый крайний аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 примыкает к домену VH и является амино-концом шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

Используемый здесь термин "домен CH2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела в соответствии с общепринятой схемой нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Кабату; и остатки 231-340, в соответствии с системой нумерации EU, см. Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Домен CH2 уникален тем, что он не тесно связан с другим доменом. Напротив, между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG расположены две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Также хорошо задокументировано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

Используемый здесь термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три различных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol 161: 4083 (1998)).

Используемый здесь термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиоловой группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG, области CH1 и СК связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 по системе нумерации Кабата (положение 226 или 229, система нумерации EU).

Используемый здесь термин "химерное антитело" означает любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт были получены или происходят от первого вида, а константная область (которая может быть интактной, неполной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена от второго вида. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мишень-связывающая область или сайт будут происходить от источника, не являющегося человеком (например, от мыши или примата), а константная область является человеческой.

Используемый здесь "процент гуманизации" вычисляют путем определения количества различий аминокислот каркасных областей (то есть, различий, не относящихся к CDR) между гуманизованным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания полученного числа из общего количества аминокислот и последующего его деления на общее количество аминокислот и умножения результата на 100.

Под понятием "специфически связывается" или "обладает специфичностью к" обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что это связывание сообщает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. В соответствии с этим определением, можно сказать, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена с большей активностью, чем с рандомизированным неродственным эпитопом. Используемый здесь термин "специфичность" употребляется для обозначения относительной аффинности связывания определенного антитела с определенным эпитопом. Так, например, можно сказать, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью в отношении данного эпитопа, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

Используемые здесь термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как прогрессирование рака. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, ослабление симптомов, уменьшение распространенности заболевания, стабилизацию (то есть, отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное облегчение течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), независимо от

того, были ли они диагностированы или нет. "Лечение" также может означать повышение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Пациентами, нуждающимися в лечении, являются пациенты, которые уже имеют такое заболевание или расстройство, а также пациенты, у которых имеется предрасположенность к такому заболеванию или расстройству, или пациенты, нуждающиеся в профилактике такого заболевания или расстройства.

Используемые здесь термины "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее" относятся к любому животному, а в частности млекопитающему, для которого желательны постановка диагноза, прогноз или проведение терапии. Млекопитающими являются человек, домашние животные, сельскохозяйственные животные, животные, содержащиеся в зоопарках, животные, участвующие в спортивных состязаниях, или другие животные, такие как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.п.

Используемые здесь словосочетания, такие как "пациент, нуждающийся в лечении" или "индивидуум, нуждающийся в лечении", относятся к индивидуумам, таким как млекопитающие, которым было бы полезно введение антитела или композиции согласно изобретению, используемых, например, для детектирования, для диагностических процедур и/или для лечения.

Антитела и их фрагменты против клаудина 18.2.

Настоящее изобретение относится к антителам против клаудина 18.2 с высокой аффинностью как к клаудину 18.2 дикого типа, так и к обычному мутанту M149L (в клетке SU620, эндогенно экспрессирующей эту мутацию). Насколько известно авторам настоящего изобретения, все известные в настоящее время белки против клаудина 18.2 не связываются с этим мутантом. Таким образом, антитела согласно изобретению обладают уникальным преимуществом, заключающимся в том, что они способны нацеливаться как на белок клаудина 18.2 дикого типа, так и на мутантный белок M149L клаудина 18.2. Это преимущество имеет очень важное значение, поскольку значительная часть больных раком имеет именно эту распространенную мутацию. Также следует отметить, что антитела согласно изобретению не связываются с другой изоформой клаудина 18, с клаудином 18.1 (или связываются с клаудином 18.1 с гораздо более низкой аффинностью).

Антитела и их фрагменты согласно изобретению продемонстрировали превосходные свойства даже при использовании клинического кандидата в качестве эталона. 175D10 (IMAB362; клаудиксимаб) в настоящее время проходит фазу III клинических испытаний по лечению аденокарциномы желудка и желудочно-пищеводного соединения. Антитела согласно изобретению и их фрагменты не только обладают более сильной связывающей активностью, но также и более высокой ADCC- и ADCP-активностью в различных других условиях по сравнению с 175D10.

Также важно отметить, что в настоящем описании продемонстрировано, что эти антитела являются высокоэффективными в индуцировании опосредованной рецептором интернализации антител даже по сравнению с IMAB362. Было высказано предположение, что значительно повышенная способность индуцировать опосредованную рецептором интернализацию антител, описанных в настоящем изобретении, может быть связана с тем, каким образом эти антитела связываются с белком клаудином 18.2. Как показано в Примере 14 и на фиг. 20, аминокислотные остатки на белке клаудине 18.2, которые играют важную роль в связывании с антителами, включают остатки, которые играют важную роль в стабилизации конформации внеклеточных петель (например, W30, L49, W50, C53, C63 и R80). W30, L49 и W50 являются частью консенсусного мотива W-LW-C-C, который способствует стабилизации конформации петли 1. C53 и C63 образуют дисульфидную связь между бета-цепями. R80, вероятно, играет важную роль в поддержании взаимодействия между параллельными молекулами клаудина 18.2 на поверхности клетки или в стабилизации конформации петли 1.

Для связывания антител важную роль также играют остатки N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60, E62, Y169 и G172. Среди них, N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62 расположены внутри  $\beta$ 3-цепи или вплоть до C63 в  $\beta$ 4-цепи. Эта область, состоящая из остатков 45-63 SEQ ID NO: 30 (NYQGLWRSCVRESSGFTEC), в настоящем изобретении называется "петлей от  $\beta$ 3 до  $\beta$ 4", которая является частью первой внеклеточной петли (петля 1) клаудина 18.2. И напротив, Y169 и G172 являются частью цепи  $\beta$ 5 (остатки 169-172 SEQ ID NO: 30; YTFG) второй внеклеточной петли (петли 2).

Предполагается, что значительно повышенная активность раскрытых здесь антител в индуцировании опосредованной рецептором интернализации антител обусловлена их способностью связываться с остатками как в петле  $\beta$ 3- $\beta$ 4, так и в цепи  $\beta$ 5. В этом контексте, считается, что известные антитела против клаудина 18.2 связываются только с одной из петель.

Экспериментальные данные также показали, что раскрытые здесь антитела обладают более высокой специфичностью связывания и повышенными ADCC и ADCP по сравнению с известными антителами.

## Последовательность человеческого клаудина 18.2

Название	Последовательность (SEQ ID NO:30)
Человеческий клаудин 18.2 (NP_001002026)	1 MAVTACQGLG FVVSLLIGIAG IIAATCM <u>QW</u> STQDLYNNPV TAVF <u>NYOGLW</u> -----
	51 RSC <u>VR</u> ES <u>SGF</u> <u>TE</u> CRGYFTLL GLPAMLQAVR ALMIVGIVLG AIGLLVSIFA ----- β3-β4 loop
	101 LKCIRIGSME DSAKANMTLT SGIMFIVSGL CAIAGVSVFA NMLVTNFWMS
	151 TANMYTGMGG MVQTVQTRY <u>T</u> <u>F</u> GAALFVGWV AGGLTLIGGV MMCIACRGLA -- -- B5
	201 PEETNYKAVS YHASGHSVAY KPGGFKASTG FGSNTKNKKI YDGGARTEDE
	251 VQSYPSKHDY V

В соответствии с одним из своих вариантов, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающим специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2), где антитело или его фрагмент связываются как с первой внеклеточной петлей, так и со второй внеклеточной петлей CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются как с петлей β3-β4, так и с цепью β5 CLDN18.2.

В соответствии с другим своим вариантом, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающим специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент также связываются с мутантом M149L белка CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент не связываются с человеческим белком клаудином 18.1 дикого типа (CLDN18.1) или не связываются с CLDN18.1 с аффинностью, которая приблизительно на 1% превышает аффинность связывания с белком CLDN18.2 дикого типа.

Аффинность связывания антитела или его фрагмента с белком может быть оценена различными способами, известными специалистам в данной области. Так, например, аффинность может быть оценена в бесклеточных анализах с отдельными белками CLDN18.1 или CLDN18.2. Однако, предпочтительно, чтобы такая оценка была проведена с использованием белка CLDN18.1 или CLDN18.2 на клеточной поверхности, имитирующей природную среду связывания. Такие анализы на связывание подробно представлены в экспериментальных примерах.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или их фрагменты обладают аффинностью связывания с мутантом M149L, которая составляет по меньшей мере 1% или, альтернативно, по меньшей мере 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% от аффинности к белку CLDN18.2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или их фрагменты не связываются с человеческим CLDN18.1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или их фрагменты, по сравнению со связыванием с CLDN18.2, обнаруживают гораздо более слабое связывание с человеческим CLDN18.1, например, не более, чем на 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% или 0,001%, без ограничений.

Как описано выше, антитела или их фрагменты согласно изобретению связываются с белком клаудином 18.2 в эпителии, который отличается от эпителия для известных антител (см. фиг. 4; по меньшей мере эталонное антитело взаимодействует с M149, тогда как раскрытые здесь антитела не взаимодействуют с ним). Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающим специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где в связывании между антителом или его фрагментом и белком CLDN18.2 дикого типа участвуют аминокислотные остатки, содержащие по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62; и по меньшей мере аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Y169 и G172 белка CLDN18.2 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с N45 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с Y46 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с G48 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с L49 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с W50 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с C53 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с V54 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с V54 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с V54 CLDN18.2.

бретения, антитело или его фрагмент связываются с R55 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с E56 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с E58 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с F60 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с E62 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с C63 CLDN18.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с двумя аминокислотными остатками, выбранными из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с тремя аминокислотными остатками, выбранными из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с четырьмя аминокислотными остатками, выбранными из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с пятью аминокислотными остатками, выбранными из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с Y169 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с G172 CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются по меньшей мере с двумя аминокислотными остатками, выбранными из Y169 и G172 CLDN18.2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в связывании участвуют аминокислотные остатки, включающие W30; два, три, четыре, пять или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62; и по меньшей мере аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из Y169 и G172 белка CLDN18.2 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в связывании участвуют аминокислотные остатки, содержащие W30, N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60, E62 и Y169 белка CLDN18.2 дикого типа.

Связи с этими аминокислотами на CLDN18.2 могут быть более слабыми по сравнению с другими аминокислотами, такими как G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сравнение проводят со связыванием той же самой аминокислоты с 175D10. Так, например, связывание антитела или его фрагмента согласно изобретению слабее, чем связывание 175D10 (карта IMG/2Dstructure-DB No: 10473) по крайней мере с одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или всеми D28, Q33, N38, V43, G59 и V79.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент не связываются с M149L белка CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент связываются с мутантным M149L белка CLDN18.2.

В соответствии с одним своим вариантом, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которые включают переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с областями CDR, как показано в комбинациях CDR в табл. А.

## Комбинации CDR тестируемых антител (нумерация по Кэбату)

Комб №.	Антитело	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
1	64G11B4	KSSQSLNLSGNQRN YLT (208)	WASTRES (227)	QNDYFYPFT (42)	NYLLE (234)	EINPGNGGSNYNEK FKG (255)	IYYGNSFAY (281)
2	65G8B8	KSSQSLNLSGNLKN YLT (209)	WASTRES (227)	QNVYIYPFT (43)	SYGVS (235)	VIWGDGNTIYHSAL KS (256)	QGLYGHAMDY (282)
3	56E8F10F4	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	WASTRES (227)	QNDYFYPFT (44)	SFGMN (236)	FISGGSNTIHYLDTV KG (257)	LALGNAMDY (283)
4	54A2C4	KSSQSLNLSGNQK NYLA (211)	GASTRES (228)	QNDLYYPWT (45)	TNAMN (237)	RIRSKSNYATYYA DSVKD (258)	GAYYGNKAFD Y (284)
5	54A2C4'	KSSQSLNLSGNQK NYLA (211)	GASTRES (228)	QNDLYYPWT (45)	NYLLE (234)	EINPGNGGSNYNEK FKG (255)	IYYGNSFAY (281)
6	54A2C4''	KSSQSLNLSGNQK NYLA (211)	GASTRES (228)	QNDLYYPWT (45)	TYSIH (238)	YINPSTIYTNYNQKF KY (259)	EGYGRGNAMDY (285)
7	44F6B11	KSNQSLNLSGNQK KYLT (212)	WASTRES (227)	QNGYSYPFT (46)	NYGMS (239)	TFSYGDSHNYSDS VKG (260)	FGRGNTMDY (286)
8	15C2B7	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	WASTRES (227)	QNNYFPLT (47)	NYGMN (240)	WINANTGEPTYAEE FKG (261)	LTRGNSFDY (287)
9	20F1E10	KSSQSLFNSGNQRN YLT (213)	WASTRES (227)	QNVYSYPLT (48)	KYGMN (241)	WISTNTGEPTYAEEF KG (262)	LVRGNSFDF (288)
10	72C1B6A3	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	RASSRES (229)	QNDYIYPYT (8)	TYPIE (242)	NFHPYNDDTKYNE KFKG (263)	RAYGYPYAMDY (289)
11	58G2C2	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	WASTRES (230)	QNSYSYPFT (49)	NYLIE (243)	VINPGRSGTNYNEK FKG (264)	TRYGGNAMDY (290)
12	101C4F12	KSSQSLNLSGNQRN YLT (208)	WSSTRDS (231)	QNNFIYPLT (50)	SYGVH (244)	VIWAGGSTNYDSAL MS (265)	SLYGNLSDS (291)
13	103A10B2	RSSMSLFNSGNQKS YLS (214)	WASTRDS (232)	HNDYIYPLT (51)	SFGVH (245)	VIWAGGSTNYNSAL MS (266)	SLYGNLSDY (292)
14	78E8G9G6	RSIQSLNLSGNQKN YLS (215)	WASTRES (227)	QNSYSYPFT (49)	SYGVH (244)	VIWAGGRTNYNSAL MS (267)	DRYGGNSLDY (293)
15	4F11E2	RSSQSLNLSGNRKN YLT (216)	WASTRES (227)	QNAYSYPFT (13)	TFGMH (246)	YITSGNSPIYFTDTV KG (268)	SSYYGNSMDY (294)
16	10G7G11	KSSQSLFNSGNQRN YLT (213)	WASTRES (227)	QNAYYFPFT (19)	TYGVH (247)	VMLSDGNTVYNSSL KS (269)	HKAYGNAMDY (295)
17	12F1F4	KSSQSLFNSGNQRN YLT (213)	WSSTRES (233)	QNNYYPFT (52)	NYGVS (248)	VIWGDGNTNYQSA LRS (270)	VGRGNAMDH (296)
18	78C10B6G 4	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	RASSRES (229)	QNDYIYPYT (8)	NYGVS (248)	VIRGDGNTNYQSAL RS (271)	VGRGNAMDH (296)
19	119G11D9	RSTQSLFNSGNQKN YLT (217)	WASTRES (227)	QNAYYYPLT (53)	GFLMH (249)	YINPYNDGTYSEK FKG (272)	LDYGNAMDY (297)
20	113G12E5	KPSQSLNLSGNQK	WASTRES	QNAFYFPC	KYGVH (250)	VIWTGGNTDYNPAL	NGYYGNAMDY

	E6	NYLA (218)	(227)	(54)		IP (273)	(298)
21	116A8B7	RSTQSLFNSGNQRN YLT (219)	WASTRES (227)	QNAYYYPLT (53)	GFLMH (249)	YINPYNDGTYKSEK FKG (272)	LDYGNAMDY (297)
22	105F7G12	KSSQSLNLSGNQK NYLA (220)	WASTRES (227)	QNAFYFPCPT (54)	KYGVH (250)	VIWTGGNTDYNPAL IP (273)	NGYYGNAMDY (298)
23	84E9E12	KSSQSVFNSGNQK NYLT (221)	WASTRES (227)	QNDYYFPLT (55)	SGYFW (251)	YISYDGSNNYNPSL KN (274)	FRFFAY (299)
24	103F4D4	RSSQSLNLSGNQK NYLT (222)	WASTRES (227)	QNAFYFPFT (56)	TYSIH (238)	YINPSTIYTNYNQKF KY (259)	EGYGRGNAMDY (285)
25	110C12B6	RSTQSLFNSGNQRN YLT (219)	WASTRES (227)	QNAYYYPLT (53)	GFLMH (249)	YINPYNDGTYKSEK FKG (272)	LDYGNAMDY (297)
26	85H12E8	KSSQSLNLSGNQRN YLS (223)	WASTRES (227)	QNAFYFPFT (56)	NYGVS (248)	VIWAGGNTNYNSA LMS (275)	HGYGKGNAMDN (300)
27	103H2B4	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	WASTRES (227)	QNNYFYPLT (57)	NFLTH (252)	EINPTNGRTYYNEK FKR (276)	IYYGNSMDY (301)
28	103F6D3	RSSQSLNLSGNQK NYLT (222)	WASTRES (227)	QNAFYFPFT (56)	TYSIH (238)	YINPNTIYTNYNQKF KY (277)	EGYGRGNAMDY (285)
29	113E12F7	KSSQSLFNSGNQKN YLT (224)	WASTRES (227)	QNNYIYPLA (58)	SYGVH (244)	VIWAGGSTNYDSAL MS (265)	SLYGNSFDH (302)
30	120B7B2	KSSQSLNLSGNQK NYLT (210)	WASTRES (227)	QNGYYFPFT (3)	GYIIQ (253)	FINPYNDGTYKNEQ FKG (278)	AYFGNSFAY (303)
31	111B12D1 1	RSSQSLFNSGNQRN YLT (225)	WASTRES (227)	QNNYIYPLA (58)	SYGVH (244)	VIWAGGSTNYDSTL MS (279)	SLYGNSFDH (302)
32	111E7E2	KSSQSLFNSGNQKN YLT (224)	WASTRES (227)	QNNYIYPLA (58)	SYGAH (254)	VIWAGGSTNYDSAL MS (265)	SLYGNSFDH (302)
33	100F4G12	KSTQSLNLSGNQR NYLT (226)	WASTRES (227)	QNAYYYPLT (53)	GFLMH (249)	YINPYNDGTYKSER FKG (280)	LDYGNAMDY (297)

Таблица В

## CDR 120B7B2 (нумерация по Кэбату)

CDR	Последовательность (SEQ ID NO:)	Варианты без риска модификации (SEQ ID NO:)
CDRL1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (210)	KSSQSLLN <u>A</u> GNQKNYLT (304) KSSQSLLE <u>S</u> GNQKNYLT (305)
CDRL2	WASTRES (227)	
CDRL3	QNGYYFPFT (3)	QNA <u>Y</u> YFPFT (19) Q <u>E</u> GYFPFT (20)
CDRH1	GYIIQ (253)	
CDRH2	FINPYNDGTYKNEQFKG (278)	FINPYND <u>D</u> TKYNEQFKG (306)
CDRH3	AYFGNSFAY (303)	AYFGNA <u>F</u> AY (307)

Таблица С

## CDR 72C1B6A3 (нумерация по Кэбату)

CDR	Последовательность (SEQ ID NO:)	Варианты без риска модификации (SEQ ID NO:)
CDRL1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (210)	KSSQSLLN <u>A</u> GNQKNYLT (304) KSSQSLLE <u>S</u> GNQKNYLT (305)
CDRL2	RASSRES (229)	
CDRL3	QNDYIYPYT (8)	
CDRH1	TYPIE (242)	
CDRH2	NFHPYNDDTKYNEKFKG (263)	
CDRH3	RAYGYPYAMDY (289)	

Таблица D

CDR 4F11E2 (нумерация по Кэбату)

CDR	Последовательность (SEQ ID NO:)	Варианты без риска модификации (SEQ ID NO:)
CDRL1	RSSQSLN <u>S</u> GNRKNYLT (216)	RSSQSLL <u>E</u> SGNRKNYLT (308) RSSQSLLN <u>A</u> GNRKNYLT (309)
CDRL2	WASTRES (227)	
CDRL3	QNAYSYPFT (13)	
CDRH1	TFGMH (246)	
CDRH2	YITSGNSPIYFTDTVKG (268)	YITSG <u>Q</u> SPIYFTDTVKG (310) YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKG (311)
CDRH3	SSYYGNSMDY (294)	SSYYG <u>Q</u> SMDY (312) SSYYG <u>E</u> SMDY (313) SSYYGN <u>A</u> MDY (314)

Антитела, которые содержали эти области CDR, независимо от того, являются ли мышинными, гуманизированными или химерными, обладали высокой активностью связывания с клаудином 18.2 и его ингибирования. Как показано в примерах 11 и 12, некоторые остатки в CDR могут быть модифицированы для сохранения или улучшения свойств или снижения их способности иметь посттрансляционные модификации (PTM). Такие модифицированные CDR могут называться здесь как CDR с созревшей аффинностью или CDR с отсутствием риска модификации.

Неограничивающие примеры CDR с отсутствием риска модификации представлены в табл. B-D в третьем столбце. Аффинно зрелые CDR могут включать CDR, имеющие одну, две или три аминокислотных добавлений, делеций и/или замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, замены могут быть консервативными заменами.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Специалистами в данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серии, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, заменимый аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления изобретения, аминокислотная цепь может быть заменена структурно аналогичной цепью, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен представлены ниже в таблице, где показатель сходства 0 или выше указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица E

Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								

<b>H</b>	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6								
<b>Q</b>	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4									
<b>N</b>	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2										
<b>E</b>	-5	0	-1	0	0	0	3	4											
<b>D</b>	-5	1	-1	0	0	0	4												
<b>T</b>	-2	0	0	1	1	3													
<b>A</b>	-2	1	1	1	2														
<b>S</b>	0	1	1	1															
<b>P</b>	-3	-1	6																
<b>G</b>	-3	5																	
<b>C</b>	12																		

Таблица F

## Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена на
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, $\beta$ -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, $\beta$ -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Таким образом, в одном своем варианте, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающим специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 выбраны из комбинаций 1-33 табл. А, или из комбинаций 1-33, где одна или более из CDRL1, CDRL2, CDRL3,



CDRH1, CDRH2 и CDRH3 включают одну, две или три аминокислотных добавлений, делеций, консервативных аминокислотных замен или их комбинаций.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антителу против CLDN18.2 или его фрагменту, которые включают CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и CDRH3, каждая из которых выбрана из группы, представленной в табл. А или в табл. В-D. Так, например, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающим специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, включающую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где: CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 208-226, или аминокислотную последовательность, происходящую от любой из последовательностей SEQ ID NO: 208-226 и полученную путем введения одной, двух или трех аминокислотных добавлений, делеций и замен; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 227-233, или аминокислотную последовательность, происходящую от любой из последовательностей SEQ ID NO: 227-233 и полученную путем введения аминокислотных добавлений, делеций и замен; CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19 и 42-58, или аминокислотную последовательность, происходящую от любой из SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19 и 42-58 и полученную путем введения одной, двух или трех аминокислотных добавлений, делеций и замен; CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 234-254, или аминокислотную последовательность, происходящую от SEQ ID NO: 234-254 и полученную путем добавления одной, двух или трех аминокислотных добавлений, делеций и замен; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 255-280, или аминокислотную последовательность, происходящую от SEQ ID NO: 255-280 и полученную путем добавления одной, двух или трех аминокислотных добавлений, делеций и замен; и CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 281-303, или аминокислотную последовательность, происходящую от SEQ ID NO: 281-3034 и полученную путем добавления одной, двух или трех аминокислотных добавлений, делеций и замен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 208-226, 304-305 и 308-309; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 227-233; CDRL3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19, 20 и 42-58; CDRH1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 234-254; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 255-280, 306, 310 и 311; и CDRH3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 281-303, 307 и 312-314.

Было показано, что антитело 120B7B2 является сильным ингибитором клаудина 18.2. Его последовательности CDR вместе с несколькими вариантами без риска модификации представлены в табл. В. В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческий белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где:

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность

QSLNLSGNQKNY (SEQ ID NO:1), QSLNAGNQKNY (SEQ ID NO:17) или

QSLLESNLSGNQKNY (SEQ ID NO:18) или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 1, 17 или 18;

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность

WAS (SEQ ID NO: 2) или аминокислотную последовательность с заменой одной или двух аминокислот, происходящую от SEQ ID NO: 2,

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность

CQNGYYFPFT (SEQ ID NO:3), QNAYYFPFT (SEQ ID NO:19) или QEGYYFPFT (SEQ ID NO: 20), или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 3, 19 или 20;

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность GYTFTGYI (SEQ ID NO: 4) или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 4;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность INPYNDGT (SEQ ID NO: 5) или INPYNDDT (SEQ ID NO: 21) или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 5 или 21; и

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность ARAYFGNSFAY (SEQ ID NO: 6) или ARAYFGNAFAY (SEQ ID NO: 22) или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или

три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 6 или 22.

Интересно отметить (см. табл. А), что CDR различных антител имеют высокую степень гомологии. Также предполагается, что каждая соответствующая CDR может быть заменена без значительного влияния на аффинность или активность связывания антитела или его фрагмента. Альтернативно, каждая конкретная аминокислота в CDR может быть заменена другой аминокислотой, присутствующей в соответствующей CDR другого антитела.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где: CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, 304 или 305 или аминокислотную последовательность с заменой одной, двух или трех аминокислот, происходящую от SEQ ID NO: 210, 304 или 305, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 или аминокислотную последовательность, имеющую одну или две аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 227; CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 19 или 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 3, 19 или 20, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 253, CDRH2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278 или 306 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 278 или 306, и CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 303 или 307 или аминокислотную последовательность с заменой одной, двух или трех аминокислот и происходящую от SEQ ID NO: 303 или 307.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, 304 или 305; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 19 или 20; CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 278 или 306; а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 303 или 307.

Неограничивающие примеры переменной области легкой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 192-195 и 206-207, или биологический эквивалент, такой как пептид, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 141, 192-195 и 206-207.

Неограничивающие примеры переменной области тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171, 188-191 и 205, или биологический эквивалент, такой как пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171, 188-191 и 205.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307. Неограничивающий пример антитела или его фрагмента включает переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205.

Аналогичным образом было показано, что 72C1B6A3 является подходящим антителом. Таким образом, в другом своем варианте, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, содержащую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где: CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, 304 или 305 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 210, 304 или 305, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229 или аминокислотную последовательность, имеющую одну или две аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 229; CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность с заменой одной, двух или трех аминокислот и происходящую от SEQ ID NO: 8, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242 или ами-

нокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 242; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 263, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289 или аминокислотную последовательность с заменой одной, двух или трех аминокислот и происходящую от SEQ ID NO: 289.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210, 304 или 305, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289.

Неограничивающие примеры варибельной области легкой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 185-187 и 203-204, или биологический эквивалент, такой как пептид, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 185-187 и 203-204.

Неограничивающие примеры варибельной области легкой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153 и 181-184, или биологический эквивалент, такой как пептид, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 153 и 181-184.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289. Неограничивающий пример антитела или его фрагмента включает варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

Кроме того, было показано, что 4F11E2 является подходящим антителом. Таким образом, в другом своем варианте, настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит варибельную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и варибельную область тяжелой цепи, содержащую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и где: CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, 308 или 309 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 216, 308 или 309; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 или аминокислотную последовательность, имеющую одну или две аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 227; CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или аминокислотную последовательность с заменой одной, двух или трех аминокислот и происходящую от SEQ ID NO: 13; CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 246; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, 310 или 311 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 268, 310 или 311; а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294, 312, 313 или 314 или аминокислотную последовательность, имеющую одну, две или три аминокислотные замены и происходящую от SEQ ID NO: 294, 312, 313 или 314.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216, 308 или 309, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 268, 310 или 311, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294, 312, 313 или 314.

Неограничивающие примеры варибельной области легкой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, 178-180 и 201-202, или биологический эквивалент, такой как пептид, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129, 178-180 и 201-202.

Неограничивающие примеры варибельной области тяжелой цепи включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, 175-177 и 196-200, или биологический эквивалент, такой как пептид, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159,

175-177 и 196-200.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309, CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246, CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311, а CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294. Неограничивающий пример антитела или его фрагмента включает переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202, и переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела представляют собой гуманизованные антитела. Гуманизованные антитела, как показано в примере 9, могут включать одну или более возвратных мутаций мышинового аналога. Примеры таких возвратных мутаций показаны в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его фрагмент могут включать одну, две, три, четыре, пять или более возвратных мутаций.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело против клаудина 18.2 согласно изобретению включает VL любой из SEQ ID NO: 117-144, 178-180, 185-187, 192-195, 201-202, 203-204 или 206-207, и VH любой из SEQ ID NO: 145-174, 175-177, 181-184, 188-191, 196-200 или 205 или их соответствующие биологические эквиваленты. Биологический эквивалент VH или VL представляет собой последовательность, которая включает указанные аминокислоты, но, при этом, имеет общую 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательностей. Таким образом, биологическим эквивалентом SEQ ID NO: 145 может быть VH, которая, в основном, имеет 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 145, но сохраняет CDR, и сохраняет, но необязательно, одну или более или все возвратные мутации.

Специалисту в данной области будет также очевидно, что описанные здесь антитела могут быть модифицированы так, чтобы они отличались по своим аминокислотным последовательностям от встречающегося в природе связывающего полипептида, из которого они были получены. Так, например, полипептидная или аминокислотная последовательность, полученная из указанного белка, может быть аналогичной, например, иметь определенный процент идентичности с исходной последовательностью, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, обычно не связанных с антителом. Репрезентативные модификации более подробно описаны ниже. Так, например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность, или оно может быть модифицировано путем добавления функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела, варианты или их производные согласно изобретению включают производные, которые были модифицированы, например, путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу, так, чтобы ковалентное связывание не препятствовало связыванию антитела с эпитопом. Так, например, антитела могут быть модифицированы, например, способами, которые включают, но не ограничиваются ими, гликозилирование, ацетилирование, ПЭГилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление, связывание с клеточным лигандом или другим белком, и т.п. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.п. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот. Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или их фрагменты могут быть конъюгированы с терапевтическими средствами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими средствами или ПЭГ.

В одном варианте осуществления изобретения, антитела или их фрагменты согласно изобретению ковалентно присоединены к фрагменту лекарственного средства. Фрагмент лекарственного средства может представлять собой группу или может быть модифицирован так, чтобы он включал группу, реагирующую с антителом в положении конъюгирования. Так, например, фрагмент лекарственного средства может быть присоединен посредством алкилирования (например, по эpsilon-аминогруппе лизинов или N-концу антител), восстановительного аминирования окисленного углевода, перэтерификации между гидроксильными и карбоксильными группами, амидирования по аминокислотным группам или карбоксильным группам и конъюгирования с тиолами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, число конъюгированных фрагментов лекарственного средства *r* на молекулу антитела составляет в среднем от 1 до 8; от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, *r* составляет в пределах в среднем от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления изобретения, *r* составляет в среднем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществле-

ния изобретения, р составляет в среднем от приблизительно 1 до приблизительно 20, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6, от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1 до приблизительно 4, от приблизительно 1 до приблизительно 3 или от приблизительно 1 до приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, р составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 7, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 5, от приблизительно 2 до приблизительно 4 или от приблизительно 2 до приблизительно 3.

Так, например, если химическая активация белка приводит к образованию свободных тиоловых групп, то белок может быть конъюгирован с сульфгидрильным реакционноспособным агентом. В одном аспекте изобретения, агент представляет собой агент, который по существу является специфичным в отношении свободных тиоловых групп. Такие агенты включают, например, малемид, галогенацетамиды (например, на основе йода, брома или хлора), сложные эфиры галогенов (например, йода, брома или хлора), галогенметилкетоны (например, на основе йода, брома или хлора), бензилгалогениды (например, иодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио.

Лекарственное средство может быть связано с антителом или его фрагментом посредством линкера. Подходящие линкеры включают, например, расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Расщепляемый линкер обычно подвержен расщеплению во внутриклеточных условиях. Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, такой как лизосомная протеаза или эндосомная протеаза. В репрезентативных вариантах осуществления изобретения, линкер может представлять собой дипептидный линкер, такой как валин-цитруллиновый (val-cit), фенилаланин-лизиновый (phe-lys) линкер или линкер на основе малеимидокапроновой кислоты-валина-цитрулина-п-аминобензилоксикарбонилла (mc-Val-Cit-PABA). Другой линкер представляет собой сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (smcc). Конъюгирование сульфосмcc происходит посредством малеимидной группы, которая взаимодействует с сульфгидрилами (тиолами, -SH), в то время как ее сульфо-NHS-сложный эфир взаимодействует с первичными аминами (как это наблюдается в лизине и в белке или в пептиде на N-конце). Еще одним линкером является малеимидокапроил (mc). Другие подходящие линкеры включают линкеры, гидролизующиеся при определенном pH или при pH в определенных пределах, такие как гидразоновый линкер. Дополнительные подходящие расщепляемые линкеры включают дисульфидные линкеры. Линкер может быть ковалентно связан с антителом в результате чего, это антитело должно подвергаться внутриклеточному расщеплению с высвобождением лекарственного средства, например, таким линкером может быть линкер mc и т.п.

Линкер может включать группу для связывания с антителом. Так, например, линкер может включать amino, гидроксильные, карбоксильные или сульфгидрильные реакционноспособные группы (например, малемид, галогенацетамиды (например, на основе йода, брома или хлора), сложные эфиры галогенов (например, йода, брома или хлора), галогенметилкетоны (например, на основе йода, брома или хлора), бензилгалогениды (например, иодид, бромид или хлорид), винилсульфон и пиридилтио.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент лекарственного средства представляет собой цитотоксический или цитостатический агент, иммунодепрессант, радиоизотоп, токсин или т.п. Конъюгат может быть использован для ингибирования размножения опухолевой или раковой клетки, что будет вызывать апоптоз в опухолевой или в раковой клетке, или для лечения рака у пациента. Соответственно, конъюгат может быть использован в различных условиях для лечения рака у животных. Конъюгат может быть использован для доставки лекарственного средства к опухолевой или раковой клетке. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что в некоторых вариантах осуществления изобретения, конъюгат связывается или ассоциируется с раковой клеткой, экспрессирующей клаудин 18.2, и этот конъюгат и/или лекарственное средство могут проникать внутрь опухолевой или раковой клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Одна или более специфических пептидных последовательностей в конъюгате (например, в линкере), после их проникновения в клетку, гидролитически расщепляются одной или более протеазами опухолевых клеток или раковых клеток, что приводит к высвобождению лекарственного средства. Затем, высвобожденное лекарство может свободно мигрировать внутри клетки и индуцировать цитотоксическую, цитостатическую или другую активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лекарственное средство отщепляется от антитела вне опухолевой или раковой клетки, и впоследствии лекарственное средство проникает в клетку или действует на клеточной поверхности.

Примеры фрагментов лекарственных средств или полезных нагрузок выбраны из группы, состоящей из DM1 (майтанина, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)- или N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанина), mc-MMAD (6-малеимидокапроил-монометилауристин-D или N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-2-метокси-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-[[[(1S)-2-фенил-1-(2-тиазолил)этил]амино]пропил]-1-пирролидинил]-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-(9Cl)-L-валинамида), mc-MMAF (малеимидокапроил-монометилауристин F или N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-N-метил-L-валил-L-валил-(3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метилами-

но)гептаноил-( $\alpha$ R, $\beta$ R,2S)- $\beta$ -метокси- $\alpha$ -метил-2-пирролидинпропаноил-L-фенилаланина) и *mc-Val-Cit-PAVA-MMAE* (6-малеимидакапроил-ValcCit;-(*p*-аминобензилоксикарбонил)-монометилауристатина E или N-[[[4-[N-[6-(2,5-дигидро-2,5-диоксо-1H-пиррол-1-ил)-1-оксогексил]-L-валил-1H-(аминокарбонил)-L-орнитил]амино]фенил]метокси]карбонил]-N-метил-L-валил-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-гидрокси-1-метил-2-фенилэтил]амино]-1-метокси-2-метил-3-оксoproпил]-1-пирролидинил]-2-метокси-1-[(1S)-1-метилпропил]-4-оксобутил]-N-метил-L-валинамида). DM1 является производным майтанзина, то есть, ингибитора тубулина, тогда как MMAD, MMAE и MMAF являются производными ауристатина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент лекарственного средства выбран из группы, состоящей из *mc-MMAF* и *mc-Val-Cit-PAVA-MMAE*. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент лекарственного средства представляет собой майтанзиноид или ауристатин.

Антитела или их фрагменты могут быть конъюгированы или связаны с терапевтическим средством, которое может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий воздействие ультразвука, нерадиоактивную метку, их комбинации и другие подобные агенты, известны специалистам в данной области.

Антитела могут быть детектируемо помечены меткой путем их связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие антигенсвязывающего полипептида с хемилюминесцентной меткой затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в процессе химической реакции. Примерами особенно подходящих соединений для хемилюминесцентного мечения являются люминол, изолюминол, ароматический эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир щавелевой кислоты.

Антитела также могут быть детектируемо помечены меткой с использованием испускающих флуоресценцию металлов, таких как  $^{152}\text{Eu}$  или другие металлы лантанидного ряда. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием групп, образующих хелатные комплексы с металлами, таких как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA). Методы конъюгирования различных фрагментов с антителом хорошо известны специалистам, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2<sup>nd</sup> Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52: 119-58 (1982)).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител.

Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно изобретению. Полинуклеотиды согласно изобретению могут кодировать полноразмерные переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида. Кроме того, полинуклеотиды согласно изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотида.

Способы получения антител хорошо известны специалистам в данной области и описаны в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переменная и константная области антигенсвязывающих полипептидов согласно изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с применением методик, описанных в литературе и в настоящем изобретении. Так, например, полностью человеческие антитела против конкретного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для вырабатывания таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но эндогенные локусы которого были отключены. Типичные методики, которые могут быть применены для получения таких антител, описаны в патентах США: 6150584; 6458592; 6420140, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Способы лечения.

Как описано в настоящем изобретении, антитела, варианты, производные или конъюгаты антитело-лекарственное средство согласно изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение также относится к терапии на основе антител, которая включает введение антител, фрагментов или конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящей заявке. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, но

не ограничиваются ими, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем изобретении) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем изобретении).

Антитела согласно изобретению также могут быть использованы для лечения или ингибирования рака. Как указано выше, клаудин 18.2 может сверхэкспрессироваться в опухолевых клетках, а в частности, в опухолях желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичников и легких. Было показано, что ингибирование клаудина 18.2 полезно для лечения опухолей.

Соответственно, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления изобретения, такой способ включает введение пациенту эффективного количества антитела, фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента сверхэкспрессирует клаудин 18.2.

В настоящем изобретении также описана клеточная терапия, такая как Т-клеточная терапия с использованием Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR). Может быть также использована подходящая клетка, которая будет контактировать с антителом против клаудина 18.2 согласно изобретению (или, альтернативно, она может быть сконструирована для экспрессии антитела против клаудина 18.2 согласно изобретению). После такого контактирования или конструирования, клетка может быть затем введена больному раком, нуждающемуся в лечении. Больной раком может иметь рак любого из описанных здесь типов. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, но не ограничивается ими, например, опухоль-инфильтрирующий Т-лимфоцит, CD4<sup>+</sup>-Т-клетку, CD8<sup>+</sup>-Т-клетку или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка была выделена непосредственно у больного раком. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетка была предоставлена донором или взята из банка клеток. Если клетка была взята у больного раком, то нежелательные иммунные реакции могут быть сведены к минимуму.

Неограничивающие примеры рака включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак прямой и ободочной кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак головы и шеи, рак почек, лейкоз, рак печени, рак легких, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак представляет собой один или более видов рака желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичников и легких.

Дополнительными заболеваниями или состояниями, которые могут быть ассоциированы с повышенной выживаемостью клеток, и которые могут быть подвергнуты лечению, профилактике, диагностике и/или прогнозированию с использованием антител или их вариантов или производных согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, прогрессирующие и/или метастазирующие злокачественные новообразования и родственные расстройства, такие как лейкоз (включая острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз)), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, микросаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточная карцинома, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичек, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома.

Конкретные дозы и схемы лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от ряда факторов, включая конкретно используемые антитела, их варианты или производные, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию препаратов и тяжесть конкретного заболевания, подвергаемого лечению. Оценка таких факторов входит в компетенцию специалистов-медиков. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, пути введения, типа состава, свойств используемого соединения, тяжести заболевания и желаемого эффекта. Используемое количество может быть определено в соответствии с фармакологическими и фармакокинетическими принципами, хорошо известными специалистам в данной области.

Способы введения антител, фрагментов или конъюгатов антитело-лекарственное средство включают, но не ограничиваются ими, внутрикожное, внутримышечное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым удобным способом, например, путем инфузии или инъекции ударной дозы, посредством всасывания через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.п.), и эти полипептиды или композиции могут быть введены вместе с другими биологически активными веществами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интрацестерально, интравагинально, внутривенно, местно (в виде порошков, мазей, капель или чрескожных пластырей), трансбуккально или в виде пероральных или интраназальных спреев.

Используемый здесь термин "парентеральный" относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, внутривенную, интрацестеральную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антитела согласно изобретению в центральную нервную систему любым подходящим способом, включая внутривенную и подоболочечную инъекцию; при этом, внутривенная инъекция может быть облегчена с помощью внутривенного катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Омма. Внутривенное введение может быть также осуществлено, например, с помощью ингалятора или аэрозольного распылителя, а также путем введения композиции, содержащей аэрозольный агент.

Может оказаться желательным местное введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций согласно изобретению в область, подлежащую лечению; и это может быть достигнуто, например, способами, включая, но не ограничиваясь ими, местное вливание во время операции, местное введение, например, в сочетании с перевязкой раны после операции, инъекцию с помощью катетера, введение с помощью суппозитория или с помощью имплантата, где указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как эластичные мембраны или волокна. Предпочтительно, при введении белка, включая антитело согласно изобретению, необходимо соблюдать осторожность и использовать материалы, на которых белок не абсорбируется.

Количество антител, фрагментов или конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению, которое будет эффективным при лечении, ингибировании и профилактике воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, для определения оптимальных интервалов доз могут быть проведены, но необязательно, анализы *in vitro*. Точная доза вводимого препарата также будет зависеть от способа введения и тяжести заболевания, расстройства или состояния и должна быть определена в соответствии с рекомендациями лечащего врача и особенностями каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, построенных по данным, полученным в тест-системах *in vitro* или на животных-моделях.

Обычно, вводимая пациенту доза антител, фрагментов или конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела других видов, что обусловлено иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно введение более низких доз человеческих антител и менее частое введение. Кроме того, дозы и частота введения антител согласно изобретению могут быть снижены за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в головной мозг) посредством модификаций, таких как, например, липидизация.

В дополнительном варианте осуществления изобретения, композиции согласно изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые могут быть введены вместе с композициями согласно изобретению, включают, но не ограничиваются ими, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, антитело против CD40, CD40L и TNF- $\alpha$ .

В дополнительных вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению вводят в сочетании с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, лучевая терапия.

Композиции.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела, фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция дополнительно включает второе противораковое средство (например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа).

В конкретном варианте осуществления изобретения, термин "фармацевтически приемлемый" относится к препарату, одобренному Регуляторными органами Федерального правительства или Правительства штата, или указанному в Фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее для введения



животным, а более конкретно, человеку. Кроме того, "фармацевтически приемлемый носитель" обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий агент или вспомогательное вещество любого типа.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно растворы для инъекций. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое сепарированное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, при желании, может также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих агентов или рН-забуферизующих агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также могут быть использованы антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; а также агенты для коррекции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Композиция может быть приготовлена в виде суппозитория с традиционными связующими и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального введения может включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, натрий-содержащего сахара, целлюлозы, карбоната магния и т.д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences EW Martin, которое включено в настоящее описание посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, для обеспечения формы, подходящей для введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

В одном варианте осуществления изобретения, композицию приготавливают в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Обычно, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, композиция может также включать солибилизующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для купирования боли в месте инъекции. Обычно, ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в смеси друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композицию используют для инфузии, то ее можно вводить в бутылку для инфузии, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической чистоты. Если композицию вводят путем инъекции, то она может быть заключена в ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Соединения согласно изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные анионами, такими как соли соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.п., и соли, образованные катионами, такие как соли натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.п.

### Примеры

Пример 1. Получение мышинных моноклональных антител против изоформы 2 человеческого клаудина 18 (CLD 18A2).

#### а) Иммунизация:

Мышей Balb/c и C57/BL6 иммунизировали эукариотическими экспрессионными векторами, кодирующими фрагменты человеческого клаудина 18.2 (CLD 18A2). 50 мкг плазмидной ДНК вводили в четырехглавую мышцу (внутримышечно, i.m.) на 1-й и 10-й день. Наличие антител, направленных против человеческого CLD 18A2, в сыворотке мышей оценивали на 20-й день с помощью проточной цитометрии с использованием клеток НЕК293, транзистентно трансфицированных нуклеиновой кислотой, кодирующей человеческий CLD 18A2. Мышей с детектируемым иммунным ответом (фиг. 1) ревакцинировали за три и два дня до слияния путем внутрибрюшинной инъекции  $5 \times 10^7$  клеток НЕК293, транзистентно трансфицированных нуклеиновой кислотой, кодирующей человеческий CLD 18A2.

б) Получение гибридом, продуцирующих моноклональные человеческие антитела против CLDN18.2:

Мышечные спленоциты выделяли и подвергали слиянию с ПЭГ с получением клеточной линии мышечной миеломы в соответствии со стандартными протоколами. Полученные гибридомы затем подверга-

ли скринингу на продуцирование иммуноглобулинов со специфичностью к CLD 18A2 с использованием клеток НЕК293, трансфицированных нуклеиновой кислотой, кодирующей человеческий CLD18, с помощью клеточного ELISA.

Моноклеточные суспензии лимфоцитов селезенки от иммунизированных мышей подвергали слиянию с несекретирующими клетками мышшиной миеломы P3X63Ag8U.1 (ATCC, CRL 1597) в соотношении 2:1 с использованием 50% ПЭГ (Roche Diagnostics, CRL 738641). Клетки высевали в количестве приблизительно  $3 \times 10^4$ /лунку в плоскодонные микротитрационные планшеты с последующим инкубированием приблизительно в течение двух недель в селективной среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 2% добавки для слияния гибридом и клонирования (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) плюс 10 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанола, 50 мкг/мл гентамицина и  $1 \times$  HAT (Sigma, CRL H0262). Через 10-14 дней, отдельные лунки подвергали скринингу с помощью клеточного ELISA на наличие моноклональных антител против CLD 18A2 (фиг. 2). Гибридомы, секретирующие антитела, повторно высевали, снова подвергали скринингу с НЕК293, экспрессирующим CLD 18A2 или CLD 18A1, с помощью FACS, и, если они все еще были позитивными по CLDN18.2 и негативными по CLDN18.1, то их субклонировали путем лимитирующего разведения. Затем стабильные субклоны культивировали *in vitro* для получения небольших количеств антител в среде для культивирования ткани в целях характеристики. Был выбран по меньшей мере один клон от каждой гибридомы, сохранивший активность родительских клеток (по данным FACS). Для каждого клона создавали три банка клеток в ампулах, которые хранили в жидком азоте.

с) Отбор моноклональных антител, связывающихся с CLDN18.2, но не с CLDN18.1: Для определения изотипа антител проводили ELISA на конкретный изотип. Набор для идентификации мышшиных моноАВ (Zymed, CRL 90-6550) использовали для определения подклассов Ig идентифицированных моноклональных антител, реагирующих с CLDN18.2. Было получено 32 клеточных линии гибридомы:

64G11B4, 65G8B8,

56E8F10F4, 54A2C4, 44F6B11, 15C2B7, 20F1E10, 72C1B6A3, 58G2C2, 101C4F12, 103A10B2, 40C10E3, 78E8G9G6, 4F11E2, 10G7G11, 12F1F4, 78C10B6G4, 119G11D9, 113G12E5E6, 116A8B7, 105F7G12, 84E9E12, 103F4D4, 110C12B6, 85H12E8, 103H2B4, 103F6D3, 113E12F7, 120B7B2, 111B12D11, 111E7E2 и 100F4G12,

с подробным описанием, приведенным ниже:

64G11B4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 65G8B8, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 56E8F10F4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 54A2C4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 44F6B11, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 15C2B7, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 20F1E10, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 72C1B6A3, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 58G2C2, мышшиное моноклональное антитело IgG2ак  
 101C4F12, мышшиное моноклональное антитело IgG2бк  
 103A10B2, мышшиное моноклональное антитело IgG2бк  
 40C10E3, мышшиное моноклональное антитело IgG1λ  
 78E8G9G6, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 4F11E2, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 10G7G11, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 12F1F4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 78C10B6G4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 119G11D9, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 113G12E5E6, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 116A8B7, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 105F7G12, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 84E9E12, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 103F4D4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 110C12B6, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 85H12E8, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 103H2B4, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 103F6D3, мышшиное моноклональное антитело IgG1к  
 113E12F7, мышшиное моноклональное антитело IgG2ак  
 120B7B2, мышшиное моноклональное антитело IgG2ак

111B12D11, мышинное моноклональное антитело IgG2ак

111E7E2, мышинное моноклональное антитело IgG2ак

100F4G12, мышинное моноклональное антитело IgG3к

Пример 2. Секвенирование гибридомы.

Клетки гибридомы ( $1 \times 10^7$ ) собирали, и общую РНК экстрагировали с использованием Tri-реагента, как описано выше для ткани селезенки. кДНК получали с использованием набора Superscript III в соответствии с инструкциями производителя, описанными выше. Полученный продукт кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами VhRevU и VhFogU, а затем полученный продукт ПЦР длиной 300 п.о. очищали с помощью набора для ПЦР-очистки и секвенировали с использованием того же праймера. Реакцию ПЦР также проводили с использованием праймеров, специфичных для V-области легкой цепи, VkRev7 и VkFog (только для варибельной области) или праймеров КарраFog (для всей легкой кап-па-цепи). Реакции секвенирования проводили на очищенном продукте ПЦР с получением последовательностей ДНК для антител

64G11B4, 65G8B8,

56E8F10F4, 54A2C4, 44F6B11, 15C2B7, 20F1E10, 72C1B6A3, 58G2C2, 101C4F12, 103A10B2, 40C10E3, 78E8G9G6, 4F11E2, 10G7G11, 12F1F4, 78C10B6G4, 119G11D9, 113G12E5E6, 116A8B7, 105F7G12, 84E9E12, 103F4D4, 110C12B6, 85H12E8, 103H2B4, 103F6D3, 113E12F7, 120B7B2, 111B12D11, 111E7E2 и 100F4G12.

Их варибельные (VH и VL) последовательности показаны ниже в табл. 1.

Таблица 1

Последовательности варибельных областей антител

Цепь антитела	Последовательность	SEQ ID NO:
<b>Легкие цепи</b>		
64G11B4	DIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMNCSSQSLN SGNQRNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQADDLA VYYCQNDYFY PFTFGAGTNLELK	117

65G8B8	DIMMTQSPSSLTVTTGEKVTLTCKSSQSLLNSGNLKNYL WYQQKPGHPP KLLIYWASTRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLT VYYCQNVYIY PFTFGSGTKLEMR	118
56E8F10F4	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTISSVQAADLA VYYCQNDYYF PFTFGSGTKLEIK	119
54A2C4	DTVMTQFPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNGGNQKNYL AWYQQKPGQPP KLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDLYY PWTFGGGKLEFK	120
44F6B11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVMISCKSNQSLLNSGNQKKYL TWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSESGTDFTLTISSVRAEDLA VYYCQNGYSY PFTFGSGTKLEMK	121
15C2B7	DIVMTQSPSSLTVTAGGKVTVSCKSSQSLLNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQTEDLA VYYCQNNYYF PLTFGAGTKLELK	122
20F1E10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSFLNSGNQRNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFILTITKVQAEDLA VYYCQNVYSY PLTFGAGTKLELK	123
72C1B6A3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYL TWYQQRPGQPP KLLIYRASSRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV	124

	YYCQNDYIY PYTFGGGTKLEMN	
58G2C2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP TLLIFWAFTRRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLA VYYCQNSYSY PFTFGSGTKLEIK	125
101C4F12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQRNYL TWYQQKPGQPP RLLIYWSSTRDSGVPDRFTGSGSRTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNNFIY PLTFGAGTKLELK	126
103A10B2	DIVMTQSPSSLVTVPGEKVTMSCRSSMSLFNSGNQKSYLS WYHQKPGQPP KLLIYWASTRDSGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCHNDYIY PLTFGAGTKLELK	127
78E8G9G6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCRSIQSLLNSGNQKNYL SWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTIRSVLDEDLA VYYCQNSYSY PFTFGSGTKLEMK	128
4F11E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLTCRSSQSLLNSGNRKNYLT WYQQIPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYSY PFTFGSGTKLEKK	129
10G7G11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCKSSQSLFNSGNQRNYL TWYQRKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTVSSVQAEDLA VYYCQNAYYF PFTFGSGTKLEKK	130
12F1F4	DIVMTQSPSSLVTARERVSMTCKSSQSLFNSGNQRNYL	131

	TWYQQKPGQPP KLLIYWSSSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAI YFCQNNYYY PFTFGSGTKLEIK	
78C10B6G4	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQRPGQPP KLLIYRASSRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYCQNDYIY PYTFGGGKLEMN	124
119G11D9	DIVMTQSPSSLVTAGERVTMRCRSTQSLFNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGGGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYYY PLTFGAGTKLERK	132
113G12E5E6	DIVMTQSPSSLVTAGERVTMSCKPSQSLNLSGNQKNYL AWYQQKPGQPP KLLLYWASTRESGVPDRFKGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYFY PCTFGGGKLEMK	133
116A8B7	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSTQSLFNSGNQRNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYYY PLTFGVGKLERK	134
105F7G12	DIVMTQSPSSLVTAGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYL AWYQQKPGQPP KLLLYWASTRESGVPDRFKGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYFY PCTFGGGKLEMK	135
84E9E12	DIVMTQSPSSLVTVTGEEKVTMSCKSSQSVFNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLVYWASTRESGVPARFTGSGSGTVFTLTISSVQAEDLA VYYCQNDYYF	136

	PLTFGAGTRLELK	
103F4D4	DIVMTQSPSSQTVTAGEKVTLSRQSSQSLNNGGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTFTISSVQAEDLA VYYCQNAYFY PFTFGAGTKLELK	137
110C12B6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSTQSLFNSGNQRNYL TWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYYY PLTFGVGTKLERK	134
85H12E8	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCSSQSLNNSGNQRNYL SWYQQEPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNIQAEDLAL YFCQNAYFY PFTFGSGTKLEIK	138
103H2B4	DILMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNSGNQKNYL TWYQQKPGQSP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNNYFY PLTFGVGTKLELK	139
103F6D3	DIVMTQSPSSQTVTAGEKVTLSRQSSQSLNNGGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTFTISSVQAEDLA VYYCQNAYFY PFTFGAGTKLELK	137
113E12F7	DIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTISSVQAEDLA VYYCQNNYIY PLAFGTGTKLELK	140
120B7B2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNSGNQKNYL TWYQQRPGQPP	141

	KLLMYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSGQAEDL AIYFCQNGYYF PFTFGSGTKLETK	
111B12D11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSSQSLFNSGNQRNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNNYIY PLAFGAGTKLELK	142
111E7E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYL TWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNNYIY PLAFGAGTKLELK	143
100F4G12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCKSTQSLNLSGNQRNYL TWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPERFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLA VYYCQNAYYY PLTFGPGTKLERK	144
<b>Тяжелые цепи</b>		
64G11B4	QVQLHQSGTELVRPGTSVKVSKASGYAFTNYLLEWVK QRPGQGLEWIGE INPGNGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSV DSAVYFCARIY YGNSFAYWGQGLTVSA	145
65G8B8	QVQLKESGPELVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWSVRQP PGKGLEWLGV IWGDGNTIYHSALKSRLSISRDNKRQVFLKVNSLQIDDT ATYYCAKQGL YGHAMDYWGQGTSVIVSS	146
56E8F10F4	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFNSFGMNWVR QAPEKGLEWVAF ISGGSNTHYLDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSED	147



	AMYYCTRLA LGNAMDYWGQGTSVIVSS	
54A2C4	EVQH VETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNAMNWVR QAPGKGLEWVAR IRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYVQMNNL KTEDTAMYYCVS GAYYGNSKAFDYWGQGLTVTSA	148
54A2C4'	QVQLHQSGTELVRPGTSVKV SCKASGYAFTNYLLEWVK QRPQGQLEWIGE INPGNGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSV DSAVYFCARIY YGNSFAYWGQGLTVTSA	145
54A2C4''	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFPTYSIHWLK QGPGQGLEWIGY INPSTIYTNYNQKFKYKATLTADKSSSTAYIQLSSLTSDDS AVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSTVTVSS	149
44F6B11	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSNYGMSWVR QTPDKRLEWVAT FSYGDSHNYSDSVKGRFTISRDIAKDALYLMSSLRSED TAIYYCARFG RGNTMDYWGQGTSTVTVSL	150
15C2B7	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGKGLKWMAW INANTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSARSAYLQINSLKNED TATYFCARLT RGNSFDYWGQGTTLTVSS	151
20F1E10	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVRQ APGKGLKWMGW ISTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAFLQINNKNEDT ATYFCARLV RGNSFDYWGQGITLTVSS	152
72C1B6A3	QVQLQQSGGELVKPGASVKMSCKAFGYTFTTYPIEWMK	153

	QNHGKSLEWIGN FHPYNDDTKYNEKFKGKAKLTVEKSSSTVYLEVSRLTSD DSAVVYCARRA YGYPYAMDYWGQGTSVTVSS	
58G2C2	QVHLQQSGAEVVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWIKK RPGQGLEWVGV INPGRSGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSD DSAVYFCARTR YGGNAMDYWGQGTSVTVSS	154
101C4F12	QVQLKESGPGQVAPSQSLSIAC TVSGFSLSSYGVHWVRQ PPGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSALMSRLTISKDNSRTRVFLKMNSLQTTD TAIYYCARSLY GNSLDSWGP GTTLTVSS	155
103A10B2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGLSLTSFGVHWIRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVY LKMHSLQTTD TAMY YCARSLY GNSFDYWGQGTALT VSS	156
40C10E3	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSSYGVNWVRQP PGKGLEWLAA IRSDGIITYNSVLKSRLRISKDNSKSQVFLKMNSLQTTDD AMFYCARWFR GNVLDYWGQGTSVTVSS	157
78E8G9G6	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLISYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGR TNYSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTYD TAMY YCARDRY GGNSLDYWGQGTSVTVSS	158
4F11E2	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLS CAASGFTFSTFGMHWVR QAPEKGLEWVAY ITSGNSPIYFTD TVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLGSED T AVYYCARSS	159

	YYGNSMDYWGQGTSVTVSS	
10G7G11	QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTISGFSLNTYGVHWVRQP PGKGLEWL VV MLSDGNTVYNSSLKSRSLTKDNSKSQLLLKMNSLQTDD TAIYYCARHKA YGNAMDYWGQGTSVTVSS	160
12F1F4	QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTVSGFSLINYGVSWVRQP PGKGLEWLGV IWGDGNTNYQSALRSRLSIRKDTSKSQVFLKLNSVHTDG TATYYCAKVGR GNAMDHWGQGISVIVSS	161
78C10B6G4	QVQLKESGPGPLVAPSQSL SITCTVSGFSLINYGVSWVRQP PGKGLEWLGV IRGDGNTNYQSALRSRLSIRKDTSKSQVFLKLNSVHTDGT ATYYCAKVGR GNAMDHWGQGISVIVSS	162
119G11D9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGFLMHWVK QKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAFMELSSLTSD SAVYYCARLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	163
113G12E5E6	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSDFLTKYGVHWFRQ SPGKGLEWLGV IWTGGNTDYNPALIPRLSFRKDNSKSVFFKMNSLQSSDT AVYYCARNGY YGNAMDYWGQGTSVTVSS	164
116A8B7	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKSSGYTFTGFLMHWVK QKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSD SAVYYCGRLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	165
105F7G12	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSDFLTKYGVHWFRQ SPGKGLEWLGV	164

	IWTGGNTDYNPALIPRLSFRKDNSKSQVFFKMNSLQSSDT AVYYCARNGY YGNAMDYWGQGTSVTVSS	
84E9E12	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLSCSVTGYSITSGYFWTFR QFPGNKLEWMG YISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDT ATYYCASFR FFAYWGQGLVTVSA	166
103F4D4	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFPTYSIHWLK QGPGQGLEWIGY INPSTIYTNYNQKFYKATLTADKSSSTAYIQLSSLTSDDS AVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSVTVSS	149
110C12B6	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKSSGYTFTGFLMHVVK QKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSDS SAVYYCGRLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	165
85H12E8	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSNYGVSWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGNTNYNSALMSRLRISKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTARYYCARHGY GKGNAMDNWGQGTSVTVSS	167
103H2B4	QVQLQQPGAEPVKPGASVKLSCKASGYSFTNFLTHWVR QRPQGLEWIGE INPTNGRITYYNEKFKRKATLTVDKSSSTTVYMQLSNLTPE DSAVFYCARIY YGNAMDYWGQGLVTVSA	168
103F6D3	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFPTYSIHWLK QGPGQGLEWIGY INPNTIYTNYNQKFYKTTLTADKSSSTAYIQLSSLTSDDS AVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSVTVSS	169

113E12F7	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVTGFSLSYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSALMSRLSISKDRSKSQVFLKMTSLQTDD TAMYYCARSLY GNSFDHWGQGTTLTVSS	170
120B7B2	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGYIIQWMK QKPGLGLEWIGF INPYNDGTKYNEQFKGKATLTSDKSSNAAYMELSSLTSE DSAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTTLTVSA	171
111B12D11	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGVHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSTLMSRLSISKDRSKSQVFLKMTSLQTDD TAMYYCARSLY GNSFDHWGQGTTLTVSS	172
111E7E2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTSYGAHWVRQP PGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSALMSRLSISKDRSKSQVFLKMTSLQTDD TAMYYCARSLY GNSFDHWGQGTTLTVSS	173
100F4G12	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGFLMHVVK QKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSERFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSDD SAVYYCARLD YGNAMDYWGQGTSTVTVSS	174

Пример 3. Получение и очистка моноклональных антител, реагирующих с CLDN18.2.

Для получения определенного количества антител в мг для функциональной характеристики, клетки гибридомы высевали в биореакторы на основе диализа (CELLine CL1000, Integra, Chur, CH) при  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Супернатант, содержащий антитела, собирали один раз в неделю. Каждое мышинное моноклональное антитело очищали с использованием геля Melon (Pierce, Rockford, USA) и концентрировали осаждением сульфатом аммония. Концентрацию и чистоту антител оценивали с помощью электрофореза в геле с додецилсульфатом натрия и окрашивания кумасси.

Пример 4. Связывание мышинных моноклональных антител, реагирующих с CLDN18.2.

Клетки MKN45, которые сверхэкспрессировали CLDN18.2, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми антителами, указанными на фиг. 3, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что очищенное мышинное антитело может связываться с клетками MKN45, трансфицированными человеческим CLDN18.2, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой  $EC_{50}$ , по сравнению с антителом, используемым в качестве позитивного контроля.

Пример 5. Связывание мышинных моноклональных антител, реагирующих с мутантным CLDN18.2.

Клетки SU620, эндогенно экспрессирующие CLDN18.2, несущие мутацию M149L, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми антителами, указанными на фиг. 4, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что очищенное мышинное антитело

может связываться с клетками SU620, эндогенно экспрессирующими человеческий CLDN18.2, несущий мутацию M149L, как было определено с помощью проточной цитометрии, с высокой  $EC_{50}$ , в то время как контрольное антитело не выполняло такой функции (фиг. 4).

Пример 6. Связывание мышинных моноклональных антител, реагирующих с CLDN18.2 мышей и собакоподобных обезьян.

Для оценки перекрестной реактивности этих антител с CLDN18.2 мыши и собакоподобных обезьян, клетки НЕК293, которые сверхэкспрессировали CLDN18.2 мышей, собакоподобных обезьян или человека, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми антителами, указанными на фиг. 3, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что очищенные мышинные антитела могут связываться с CLDN18.2 мышей и собакоподобных обезьян, как было определено с помощью проточной цитометрии с высоким значением  $EC_{50}$ , по меньшей мере аналогичным значениям для эталонных антител (фиг. 5, 6 и 7).

Пример 7. Связывание химерных антител, реагирующих с CLDN18.2.

Мышиные гены VH и VK были получены путем синтеза, а затем соответственно клонированы в векторы, содержащие константные домены гамма-1 и каппа человека. Очищенные химерные антитела получали из трансфицированных клеток CHO.

Клетки MKN45, которые стабильно экспрессировали CLDN18.2 или CLDN18.1 человека, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми химерными антителами, указанными на фиг. 4, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что химерные антитела могут связываться с человеческим CLDN18.2 с высоким значением  $EC_{50}$ , но не с CLDN18.1 (фиг. 8 и 9).

Пример 8. Антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) химерных антител.

В биоанализе на ADCC с использованием репортерного гена проводили альтернативное считывание на более ранней стадии активации пути ADCC MOA, то есть, активации транскрипции гена по пути NFAT (ядерного фактора активированных Т-клеток) в эффекторной клетке. Кроме того, в биоанализе на ADCC с использованием репортерного гена, в качестве эффекторных клеток брали сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор  $Fc\gamma RIIIa$ , вариант V158 (с высокой аффинностью) и элемент ответа NFAT, запускающий экспрессию люциферазы светляка. Биологическую активность антител в ADCC MOA количественно оценивали с помощью люциферазы, продуцируемой в результате активации пути NFAT, и активность люциферазы в эффекторной клетке количественно оценивали путем считывания люминесценции (фиг. 1). Сигнал был высоким, а фон анализа был низким.

Серийные разведения химерного моноклонального антитела против клаудина 18.2 или эталонного Ab инкубировали в течение 6 ч после индуцирования при 37°C вместе со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками в биоанализе на ADCC), в присутствии или в отсутствии клеток-мишеней, используемых в биоанализе на ADCC (экспрессирующих клаудин 18.2). Активность люциферазы количественно определяли с использованием реагента Bio-Glo™ (табл. 2). Результаты показали, что эти химерные антитела обладают очень сильной ADCC-активностью.

Таблица 2

$EC_{50}$  тестируемых антител

Антитело	$EC_{50}$ (нМ)
4F11E2	22,18
12F1F4	36,77
64G11B4	125,7
72C186A3	46,32
78E8G9G6	15,86
103F6D3	79,53
120B7B2	5,806
Эталонное Ab	458,5

Пример 9. Гуманизация мышинных mAb 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2.

Гены варибельной области mAb 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 использовали для создания гуманизованных MAb. На первой стадии этого процесса, аминокислотные последовательности VH и VL MAb сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека для поиска наиболее под-

ходящих последовательностей генов Ig зародышевой линии человека.

Аминокислотные последовательности гуманизованных антител перечислены ниже в табл. 3.

Таблица 3

Гуманизованные последовательности

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
4F11VH_1 (привитая VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVR QAPGKGLEWVSYITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSYYGNSMDYWGQGT LVTVSS	175
4F11VH_2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVR QAPGKGLEWVA YITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSYYGNSMDYWGQGT LVTVSS	176
4F11VH_3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVR QAPGKGLEWVA YITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSYYGNSMDYWGQGT LVTVSS	177
4F11VL_1 (привитая VL)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLNLSGNRKNYL TWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQNAYSYPFTFGGGTKLEIK	178
4F11VL_2	DTVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLNLSGNRKNY L TWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSVQAEDVAVYYCQNAYSYPFTFGGGTKLEIK	179
4F11VL_3	DTVMTQSPDSLAVSLGERVTLNCRSSQSLNLSGNRKNY L TWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSVQAEDVAVYYCQNAYSYPFTFGGGTKLEIK	180

72C1VH_1 (привитая VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYPIEWV RQAPGQRLEWMGNFHPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRAYGYPYAMDYW GQGLVTVSS	181
72C1VH_2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYFTTYPIEWM RQAPGQRLEWMGNFHPYNDDTKYNEKFKGRVTITVDT SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRAYGYPYAMDYW GQGLVTVSS	182
72C1VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYFTTYPIEWM KQAPGQRLEWMGNFHPYNDDTKYNEKFKGRVTITVDT SASTAYMEVSSLRSEDVAVYYCARRAYGYPYAMDYW GQGLVTVSS	183
72C1VH_4	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYFTTYPIEWM KQAPGQRLEWMGNFHPYNDDTKYNEKFKGRVTLTVD TSASTVYLEVSSLRSEDVAVYYCARRAYGYPYAMDYW GQGLVTVSS	184
72C1VL_1 (привитая VL)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSI.I.NSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQNDYIYPYTFGGGKLEIK	185
72C1VL_2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQNDYIYPYTFGGGKLEIK	186
72C1VL_3	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNY LTWYQQKPGQPPKLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSVQAEDVAVYYCQNDYIYPYTFGGGKLEIK	187
120B7VH_1 (привитая VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYIIQWV RQAPGQRLEWMGFINPYNDGTYNEQFKGRVTITRDT ASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAYFGNSFAYWGQGT LTVSS	188
120B7VH_2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYFTGYIIQWM RQAPGQRLEWMGFINPYNDGTYNEQFKGRVTITSDTS ASAAAYMELSSLRSEDVAVYYCARAYFGNSFAYWGQGT LTVSS	189



120B7VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTGYIIQWM KQAPGQRLEWIGFINPYNDGTYNEQFKGRATITSDTS ASAAYMELSSLRSEDVAVYYCARAYFGNSFAYWGQGT LVTVSS	190
120B7VH_4	EVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYIIQWM KQAPGQRLEWIGFINPYNDGTYNEQFKGRATITSDTS ASAAYMELSSLRSEDVAVYYCARAYFGNSFAYWGQGT LVTVSS	191
120B7VL_1 (привитая VL)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDF TLTISSLQAEDVAVYYCQNGYYFPFTFGGGTKLEIK	192
120B7VL_2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVAVYYCQNGYYFPFTFGGGTKLEIK	193
120B7VL_3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD FTLTISSGQAEDVAVYFCQNGYYFPFTFGGGTKLEIK	194
120B7VL_4	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNY LTWYQQKPGQPPKLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSGQAEDVAVYFCQNGYYFPFTFGGGTKLEIK	195

Гуманизированные гены VH и VL были получены путем синтеза, а затем соответственно клонированы в векторы, содержащие константные домены гамма-1 и каппа человека. Спаривание человеческих VH и VL приводило к образованию гуманизованных антител (см. табл. 4).

Таблица 4

## Гуманизованные антитела с областями VH и VL 4F11E2

VH	4F11VH_1	4F11VH_2	4F11VH_3
VL			
4F11VL_1	hu4F11.1	hu4F11.4	hu4F11.7
4F11VL_2	hu4F11.2	hu4F11.5	hu4F11.8
4F11VL_3	hu4F11.3	hu4F11.6	hu4F11.9

## 72C1B6A3

VH	72C1VH_1	72C1VH_2	72C1VH_3	72C1VH_4
VL				
72C1VL_1	hu72C1.10	hu72C1.13	hu72C1.16	hu72C1.19
72C1VL_2	hu72C1.11	hu72C1.14	hu72C1.17	hu72C1.20
72C1VL_3	hu72C1.12	hu72C1.15	hu72C1.18	hu72C1.21

## 120B7B2

VH	120B7VH_1	120B7VH_2	120B7VH_3	120B7VH_4
VL				
120B7VL_1	hu120B7.22	hu120B7.26	hu120B7.30	hu120B7.34
120B7VL_2	hu120B7.23	hu120B7.27	hu120B7.31	hu120B7.35
120B7VL_3	hu120B7.24	hu120B7.28	hu120B7.32	hu120B7.36
120B7VL_4	hu120B7.25	hu120B7.29	hu120B7.33	hu120B7.37

Пример 10. Связывание гуманизованных антител, реагирующих с CLDN18.2.

Клетки MKN45, которые стабильно экспрессировали CLDN18.2 или CLDN18.1 человека, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми гуманизованными антителами, указанными на фиг. 4, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что указанные гуманизованные антитела могут связываться с человеческим CLDN18.2 с высоким значением  $EC_{50}$ , но не с CLDN18.1 (фиг. 10 и 11).

Пример 11. Связывание гуманизованных антител с отсутствием риска РТМ (посттрансляционной модификации), реагирующих с CLDN18.2.

Во время получения терапевтического белка могут возникать посттрансляционные модификации (РТМ), которые могут создавать определенные проблемы, такие как повышенная гетерогенность, снижение биологической активности, снижение стабильности, иммуногенность, фрагментация и агрегация. Потенциальное воздействие РТМ зависит от их локализации и, в некоторых случаях, от воздействия расщепителей. CDR последовательности анализировали на следующие потенциальные РТМ: дезамидирование аспарагина, изомеризацию аспартата, образование свободных тиоловых групп цистеина, N-гликозилирование, окисление, фрагментацию по потенциальному сайту гидролиза и т.п.

Для снижения риска образования РТМ в 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2, некоторые проблемные аминокислоты в VH и VL были заменены. После этого было получено девять антител:

Клоны	HC:LC*	№.
4F11E2	HC N55Q-LC N31E	1
	HC N55Q-LC S32A	2
	HC N55E-LC S32A	3
	HC N55E&N104Q-LC S32A	8
	HC N55E&N104E-LC S32A	9
	HC N55E&S105A-LC S32A	10
72C1B6A3	HC WT-LC N31E	4
	HC WT-LC S32A	5
120B7B2	HC G57D&S104A-LC-N96E&N31E	6
	HC G57D&S104A-LC-S32A&G97A	7

\*Локализация аминокислот (например, N55) соответствует номеру аминокислотного остатка в соответствующей аминокислотной последовательности VH или VL, а не по Кэбату или Чотия.

Анти- ло	Мута- нт	Последовательность (мутация выделена)	SEQ ID NO:
4F11E2	HC N55Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHW VRQAPGKGLEWVSY ITSG <u>Q</u> SPIYFTDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLLTVSS	196
	HC N55E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHW VRQAPGKGLEWVSY ITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLLTVSS	197
	HC N55E & N104Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHW VRQAPGKGLEWVSY ITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSS YYG <u>Q</u> SMDYWGQGTLLTVSS	198
	HC N55E & N104E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHW VRQAPGKGLEWVSY ITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSS YYG <u>E</u> SMDYWGQGTLLTVSS	199
	HC N55E &	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHW VRQAPGKGLEWVSY	200

	S105A	ITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARSS YYGN <u>A</u> MDYWGGTLTVSS	
	LC N31E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLL <u>E</u> SGNRKN YLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNAYSY PFTFGGGTKLEIK	201
	LC S32A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLN <u>A</u> GNRKN YLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNAYSY PFTFGGGTKLEIK	202
72C1B6 A3	HC WT	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTYPIEW VRQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLR SEDTAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGLTVTVSS	181
	LC S32A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLN <u>A</u> GNQKN YLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDYIY PYTFGGGGTKLEIK	203
	LC N31E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL <u>E</u> SGNQKN YLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQNDYIY PYTFGGGGTKLEIK	204
120B7B 2	HC G57D &S104 A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYIIQW VRQAPGQRLEWMGF INPYND <u>D</u> TKYNEQFKGRVTITRDTASTAYMELSSLR SEDTAVYYCARAY FGN <u>A</u> FAYWGQGLTVTVSS	205
	LC-	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLN <u>A</u> GNQKN	206
	S32A &G97A	YLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQN <u>A</u> YYF PFTFGGGTKLEIK	
	LC- N96E &N31E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL <u>E</u> SGNQKN YLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQ <u>E</u> GYFF PFTFGGGTKLEIK	207

Клетки MKN45, которые стабильно экспрессировали CLDN18.2 или CLDN18.1 человека, собирали из колб. 100 мкл  $1 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали с первыми мутированными гуманизованными антителами, указанными на фиг. 4, в 3-кратных серийных разведениях, начиная со 100 нМ до 0,003 нМ, в течение 30 мин на льду. После двукратной промывки 200 мкл буфера для FACS, клетки инкубировали со вторым антителом в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS, переносили в 5 мл-пробирку BD Falcon и анализировали с помощью FACS. Результаты исследования показали, что указанные антитела могут связываться с человеческим CLDN18.2 с высоким значением EC50, но не с CLDN18.1 (фиг. 12 и 13).

Для оценки антигенсвязывающей способности вариантов 4F11E2d (HC N55E/LC S32A) и 4F11E2d (H N55E N104Q/LC S32A) без риска модификации, варианты были протестированы в клеточном анализе на связывание. Серийно разведенные антитела против CLDN18.2, начиная со 100 нМ, инкубировали с  $10^5$  клеток в течение 30 мин на льду. После промывки буфером для FACS, клетки инкубировали с APC-меченным вторым антителом в течение еще 30 мин на льду. Клетки, связанные с антителами, были проанализированы с помощью FACS. Варианты показали сильное связывание с клаудином 18.2 на клеточной поверхности (фиг. 14).

Пример 12. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) гуманизованных антител без риска РТМ.

Серийные разведения гуманизованных антител против клаудина 18.2 с отсутствием риска РТМ или эталонного Ab инкубировали в течение 6 ч после индуцирования при 37°C вместе со сконструированными эффекторными клетками Jurkat (эффекторными клетками в биоанализе на ADCC), в присутствии или в отсутствие клеток-мишеней, используемых в биоанализе на ADCC (экспрессирующих клаудин 18.2). Активность люциферазы количественно определяли с использованием реагента Bio-Glo™ (табл. 2). Результаты показали, что эти гуманизованные антитела обладают очень сильной ADCC-активностью.

Таблица 5

## ADCC

№.	Протестированное антитело	EC50 (нМ)
1	4F11E2 -HC N55Q-LC N31E	238,1
2	4F11E2 -HC N55Q-LC S32A	413,9
3	4F11E2 -HC N55E-LCS32A	148,1
4	72C1B6A3-HC WT-LC N31E	1651
5	72C1B6A3-HC WT- LCS32A	190,5
6	120B7B2-HC G57D&104A- LC-N96E&N31E	492,6
7	120B7B2-HC G57D&10 4A-LC-S32A&G97A	113,9
Ref. Ab	Эталонное Ab	158,3

Пример 13. Картирование эпитопов.

Все аминокислоты внеклеточного домена клаудина 18.2 отдельно заменяли на А. Каждый мутантный клаудин или клаудин 18.2 дикого типа переносили в клетки НЕК293. Экспрессию клаудина 18.2 оценивали с использованием указанных антител. Результаты показаны на фиг. 15 (показаны только аминокислотные остатки, где мутация приводила к снижению уровня связывания).

Как показано на фиг. 15, аминокислоты W30, N45, Y46, G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56, S58, F60, E62, C63, R80, Y169 и G172 участвуют в связывании трех протестированных антител, 4F11E2 (H4F), 72C186A3 (H72C1) и 120B7B2 (120) или эталонного антитела 175D10 (IMAB362). W30, по-видимому, образует кластер остатков в первой половине первого внеклеточного домена белка клаудина 18.2. N45, Y46, G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56, S58, F60, E62 и C63 представляют собой второй кластер остатков в одном и том же внеклеточном домене. С другой стороны, Y169 и G172, расположены на втором внеклеточном домене или вблизи от него.

Были идентифицированы кристаллические структуры различных белков клаудина. Как показано на фиг. 20 (см. Suzuki et al., Ann. NY Acad. Sci., 1397: 25-34), белки клаудина включают четыре трансмембранных сегмента, короткий внутриклеточный N-конец, большую первую внеклеточную петлю (петлю 1, или ECS1), которая содержит консенсусный мотив W-LW-C-C, более короткую вторую внеклеточную петлю (петлю 2 или ECS2) и внутриклеточный C-концевой хвост. Петля 1 включает четыре β-цепи: β1, β2, β3 и β4, а другие петли включает одну β-цепь, β5.

Замены W30, L49 и W50 на аланин, вероятно, приводят к дестабилизации конформации петли 1. Мутации C53 или C63, вероятно, нарушают дисульфидную связь между β3 и β4. R80, вероятно, играет важную роль в поддержании взаимодействия между параллельными молекулами клаудина 18.2 на клеточной поверхности или для стабилизации конформации петли 1. Остальные остатки, включая N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62 (в петле от β3 до β4) и Y169 и G172 (в β5), вероятно, представляют собой пограничную область для связывания с тестируемыми здесь антителами.

Пример 14. Сравнение гуманизованных антител 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 с эталонным анти-

телом 175D10 против клаудина 18.2.

Связывание на клеточной основе.

Для сравнения гуманизованных антител против клаудина 18.2: 4F11E2 (HC N55E/LC S32A), 72C1B6A3 (HC WT/LC S32A) и 120B7B2 (HC G57D S104A/LC S32AG97A) с эталонным антителом 175D10 (IMAB362), в этом примере определяли связывание в клетках, экспрессирующих человеческий клаудин 18.2. Клетки CHO-K1, которые стабильно экспрессировали человеческий CLDN18.2, сортировали по высокому и низкому уровню экспрессии исходя из уровня экспрессии человеческого CLDN18.2. Серийно разведенные антитела против CLDN18.2, начиная с 100 нМ, инкубировали с  $10^5$  клеток в течение 30 мин на льду. После промывки буфером для FACS, клетки инкубировали с APC-меченым вторым антителом в течение еще 30 мин на льду. Клетки, связанные с антителами, анализировали с помощью FACS.

Как показано на фиг. 16, 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 продемонстрировали превосходное связывание с 175D10 в клетках CHO-K1 как с высоким, так и с низким содержанием клаудина 18.2.

Анализ на ADCC.

Для дальнейшего сравнения ADCC-эффекта гуманизованных антител против клаудина 18.2: 4F11E2 (HC N55E/LC S32A), 72C1B6A3 (HC WT/LC S32A) и 120B7B2 (HC G57D S104A/LC S32A G97A) с эталонным антителом 175D10 (IMAB362), в этом примере описан анализ на ADCC в клетках. Вкратце, клетки NK92 совместно культивировали с клетками 293 со сверхэкспрессией клаудина 18.2 в присутствии различных доз антител против клаудина 18.2. Как показано на фиг. 17, 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 продемонстрировали более высокую ADCC-активность по сравнению с антителом 175D10.

Для некоторых терапевтических антител, усиление ADCC может увеличивать терапевтическое окно для целевой терапии на основе антител. Усиленная ADCC может быть достигнута за счет конструирования Fc-области, такой как область с мутацией S239D/I332E. В анализе на ADCC, проводимом на основе клеток NK92, антитела 4H11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 с мутациями S239D/I332E в Fc-области опосредовали более сильное NK92-опосредованное уничтожение клеток 293, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2, по сравнению с контрольным антителом 175D10 с теми же мутациями S239D/I332E (фиг. 18).

Антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP).

Влияние mAb против CLDN 18.2 на фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами оценивали в анализе *in vitro*, где CLDN18.2-позитивные клетки NUG-C4 совместно культивировали с дифференцированными макрофагами человека в присутствии различных концентраций mAb против CLDN18.2. Вкратце, CD14<sup>+</sup>-моноциты были выделены из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК) и дифференцированы *in vitro* в зрелые макрофаги в течение 6 дней. Макрофаги, полученные из моноцитов (MDM), собирали и повторно высевали в 24-луночные чашки в течение ночи в качестве эффекторных клеток. NUG-C4, экспрессирующие CLDN 18.2-eGFP в качестве клеток-мишеней, добавляли к MDM в соотношении 5 опухолевых клеток на фагоцит в присутствии различных концентраций mAb против CLDN18.2. После инкубирования в течение 3 ч, клетки-мишени, которые не подвергались фагоцитозу, отмывали с помощью PBS, а оставшиеся фагоциты собирали и окрашивали маркером для CD14-макрофагов с последующим анализом методом проточной цитометрии. Индекс фагоцитоза вычисляли путем количественного определения процента GFP<sup>+</sup>-клеток в CD14<sup>+</sup>-клетках, нормализованного по контрольному IgG.

Как показано на фиг. 19, все mAb против C18.2 значительно усиливали фагоцитоз клеток NUG-C4 в зависимости от концентрации. В случае IgG1 дикого типа и мутантных форм IgG1 S239D/I332E, антитела 4H11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 показали более сильный ADCP-эффект, чем эталонное антитело 175D10.

В целом, этот пример продемонстрировал, что недавно разработанные антитела 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2 обладают более сильным клеточным связыванием и эффективностью ADCC/ADCP, чем эталонное антитело 175D10. Предполагается, что улучшенные свойства этих новых антител могут быть ассоциированы с более высокой специфичностью связывания этих антител по сравнению со специфичностью эталонного антитела 175D10. Так, например, взаимодействие 175D10 с клаудином 18.2 является сильным по всему спектру на фиг. 15, который включает сильное связывание с D28, Q33, N38 и V43, а затем с G59 и V79. Новые антитела 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2, напротив, обладают более высокой специфичностью к W30 в пределах первой половины первого внеклеточного домена и более высокой специфичностью к G48-E56 во второй половине первого внеклеточного домена. Новые антитела также имеют немного более сильное связывание с Y46, который также находится во второй половине домена. Их связывание с D28, Q33, N38, V43, G59 и V79 значительно слабее, что, вероятно, способствовало усилению ADCC и ADCP новых антител.

Пример 15. Конъюгирование pHAb с антителами против клаудина 18.2.

Интернализацию антител против клаудина 18.2, связанных с CLDN18.2, определяли с помощью анализа на интернализацию на основе красителей, реагирующих с pHAb. Красители, реагирующие с pHAb, представляют собой красители-датчики pH, которые имеют очень низкую флуоресценцию при pH >7 и дают резкое увеличение флуоресценции, когда pH раствора становится кислотным. Красители для pHAb имеют максимумы возбуждения (Ex) на 532 нм и максимумы излучения (Em) на 560 нм. Анти-

тела, конъюгированные с красителем для рНАb, могут быть использованы для мониторинга интернализации антител, опосредованной рецептором. Если конъюгат антитело-краситель для рНАb связывается со своим рецептором на клеточной мембране, то он дает минимальную флуоресценцию. Однако, при интернализации, опосредованной рецептором, конъюгаты антитело-краситель для рНАb перемещаются в эндосомные и лизосомные везикулы, где рН является кислотным, что приводит к флуоресценции, опосредуемой красителем для рНАb. Эта флуоресценция может быть детектирована с применением различных методов, включая визуализацию клеток, проточную цитометрию и использование флуоресцентных планшет-ридеров с соответствующими фильтрами.

Экспериментальный протокол.

А. Получение антител.

27 химерных антител, 3 гуманизованных антитела и контрольный IgG1 получали путем временной трансфекции клеток ExpiCHO и очищали с помощью аффинной хроматографии на белке А.

В. Конъюгирование антитела на шариках с использованием красителя, реагирующего с тиолом рНАb.

1. Аккуратное встряхивание или использование миксера для однородного ресуспендирования шариков с белком А AmMag® (LC00695). Сохранение однородности суспензии при приготовлении аликвот шариков.

2. Добавление 50 мкл суспензии шариков в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с.

3. Взятие и удаление буфера для хранения.

4. Добавление 250 мкл PBS (рН 7,4). Перемешивание и помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Взятие и удаление буфера.

5. Добавление к шарикам 1,0 мл образца, содержащего 100 мкг антитела.

6. Перемешивание образца в течение 60 мин при комнатной температуре. Сохранение шариков в суспензии с непрерывным перемешиванием.

7. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Удаление супернатанта.

8. Добавление 250 мкл буфера для конъюгирования с тиолом (10 мМ фосфатного буфера, содержащего 1 мМ EDTA, рН 7,0) и перемешивание. Помещение пробирку на магнитную подставку на 10 с. Взятие и удаление буфера. Повторение этой стадии для двух промывок.

9. Добавление 100 мкл буфера для конъюгирования с тиолом.

10. Добавление DTT до конечной концентрации 2,5 мМ.

11. Смешивание образца в течение 60 мин при комнатной температуре. Сохранение шариков в суспензии с непрерывным перемешиванием.

12. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с и удаление буфера.

13. Добавление 250 мкл буфера для конъюгирования с тиолом и перемешивание. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Взятие и удаление буфера. Повторение этой стадии для двух промывок.

14. Добавление 100 мкл буфера для конъюгирования с тиолом.

15. Быстрое центрифугирование красителя, реагирующего с тиолом рНАb (G9835) (то есть, 14000×g в настольной центрифуге в течение 5-10 с) и растворение до концентрации 10 мг/мл путем добавления 25 мкл смеси 1:1 ДМСО-вода к 0,25 мг красителя. Смешивание путем встряхивания. Для полного растворения красителя может потребоваться 1-3 мин. Этот раствор необходимо приготавливать непосредственно перед использованием.

16. Добавление 1,2 мкл красителя, реагирующего с тиолом рНАb, к 100 мкг антитела для получения 20-молярного избытка красителя.

17. Перемешивание в течение 60 мин. Сохранение шариков в суспензии с непрерывным перемешиванием.

18. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Взятие и удаление супернатанта. 19. Добавление 250 мкл буфера для конъюгирования с тиолом и перемешивание. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Взятие и удаление буфера для связывания/промывки (PBS, рН 7,4).

20. Повторение стадии 19 для двух промывок.

21. Добавление к шарикам 100 мкл буфера для элюирования (0,1 М глицина, рН 3,0).

22. Перемешивание в течение 5 мин при комнатной температуре.

23. Помещение пробирки на магнитную подставку на 10 с. Взятие элюированного образца и его перенос в новую микроцентрифужную пробирку, содержащую 5 мкл нейтрализующего буфера (1М трис-НСl, рН 9,0).

Концентрация антител и отношение красителя к антителу (DAR) для тестируемых антител показаны в табл. 6.

Таблица 6

## Отношение красителя к антителу (DAR)

Клон	DAR
64G11B4	2,5
65G8B8	4,2
56E8F10F4	3,2
44F6B11	3,0
15C2B7	3,0
20F1E10	2,7
58G2C2	3,1
101C4F12	2,4
103A10B2	3,5
78E8G9G6	2,3
10G7G11	3,1
12F1F4	2,4
78C10B6G4	2,9
119G11D9	3,2
113G12E5E6	2,9
116A8B7	2,6
105F7G12	2,8
84E9E12	2,8
103F4D4	2,1
110C12B6	2,8
85H12E8	3,8
103H2B4	2,7
103F6D3	3,1
113E12F7	3,9
111B12D11	2,7
111E7E2	3,5
100F4G12	3,0
4F11E2 HC N55E-LC S32A (BG2001-C)	3,0
72C1B6A3 HC WT-LC S32A(BG2001-D)	2,6
120B7B2 HC G57D&S104A-LC S32A&G97A (BG2001-E)	3,0
IMAB362 (эталонное Ab)	3,3
IgG (контроль)	2,9

Пример 16. Скрининг на интернализацию антител против клаудина 18.2.

Стабильно трансфицированные клетки CLDN18.2 MKN45 человека собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific #165305) при плотности 20 К на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч перед обработкой антителами, меченными рНАb.

Для интернализации, к клеткам добавляли конъюгированные с рНАb антитела против клаудина 18.2 в двух концентрациях (20 нМ и 100 нМ) и осторожно перемешивали в течение 1-2 мин на миксере для планшетов, а затем инкубировали в течение ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinity M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности, среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

Результаты, нормализованные по DAR, показаны в табл. 7. Эффективность интернализации тести-



руемых антител была выше, чем у эталонного антитела IMAV362.

Таблица 7

## Результаты интернализации

Клон	Флуоресценция	
	20 нМ	100 нМ
64G11B4	24030	33742
65G8B8	15101	20466
56E8F10F4	19865	28672
44F6B11	18438	26089
15C2B7	19400	33174
20F1E10	21146	45093
58G2C2	18645	33059
101C4F12	15179	44394
103A10B2	11998	31328
78E8G9G6	26815	41148
10G7G11	9603	35549
12F1F4	29457	43854
78C10B6G4	16190	29146
119G11D9	21438	34049
113G12E5E6	11003	28896
116A8B7	21356	41720
105F7G12	14848	43122
84E9E12	18710	35080
103F4D4	31176	49098
110C12B6	19335	40139
85H12E8	19710	29070
103H2B4	23459	35834
103F6D3	23023	41266
113E12F7	13181	29861
111B12D11	15926	37384
111E7E2	12335	28040
100F4G12	17093	33537
4F11E2 HC N55E-LC S32A (BG2001-C)	19008	28208
72C1B6A3 HC WT-LC S32A (BG2001-D)	26203	36535
120B7B2 HC G57D&S104A-LC S32A&G97A (BG2001-E)	19204	31321
IMAV362 (эталонное Ab)	7951	18907
IgG (контроль)	854	2705

Пример 17. EC<sub>50</sub> интернализации химерных антител против клаудина 18.2 на клетках CHO, содержащих клаудин 18.2.

Стабильно трансфицированные клетки CHO с CLDN18.2 человека собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific #165305) при плотности 10 К на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч перед обработкой антителами, мечеными pNAbs.

Для интернализации, к клеткам добавляли конъюгированные с pNAbs антитела против клаудина 18.2 в различных концентрациях (100 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,03 нМ и 0,01 нМ) и осторожно перемешивали в течение 1-2 мин на миксере для планшетов, а затем инкубировали в течение

ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinity M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности, среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

Результаты, нормализованные по DAR, показаны на фиг. 21. И в этом случае, эффективность интернализации тестируемых антител была выше, чем у эталонного антитела IMAV362.

Пример 18. EC<sub>50</sub> интернализации гуманизованных антител против клаудина 18.2 на клетках CHO с клаудином 18.2.

Стабильно трансфицированные клетки CHO с CLDN18.2 человека собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific #165305) при плотности 10 К на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч перед обработкой антителами, меченными рНАb.

Для интернализации, к клеткам добавляли конъюгированные с рНАb антитела против клаудина 18.2 в различных концентрациях (100 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,03 нМ и 0,01 нМ) и осторожно перемешивали 1-2 мин на миксере для планшетов, а затем инкубировали в течение ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinity M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности, среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

Результаты, нормализованные по DAR, показаны на фиг. 22, и эти результаты показали, что эффективность интернализации тестируемых антител была выше, чем у эталонного антитела IMAV362.

Пример 19. EC<sub>50</sub> интернализации гуманизованных антител против клаудина 18.2 на клетках MKN45 с клаудином 18.2.

Стабильно трансфицированные клетки MKN45 с CLDN18.2 человека собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, 25300-054) и высевали в 96-луночный черный планшет (Thermo Scientific #165305) при плотности 10 К на 90 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20-24 ч перед обработкой антителами, меченными рНАb.

Для интернализации, к клеткам добавляли конъюгированные с рНАb гуманизованные антитела против клаудина 18.2 в различных концентрациях (100 нМ, 30 нМ, 10 нМ, 3 нМ, 1 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,03 нМ и 0,01 нМ) и осторожно перемешивали в течение 1-2 мин на миксере для планшетов, а затем инкубировали в течение ночи для обеспечения интернализации (интернализация может быть обнаружена через несколько часов). Планшеты считывали на флуоресцентном планшет-ридере при Ex/Em: 532 нм/560 нм на Tecan Infinity M1000 Pro. Для достижения более высокой чувствительности, среду перед считыванием планшета заменяли на PBS.

Результаты, нормализованные по DAR, показаны на фиг. 23, и эти результаты показали, что эффективность интернализации тестируемых антител была выше, чем у эталонного антитела IMAV362.

Пример 20. Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Каждое антитело смешивали приблизительно с трехкратным количеством TCEP и перемешивали в течение 2 ч при 37°C. В реакционную систему быстро восемь раз закапывали VC-MMAE и инкубировали в течение 1 ч на льду, и 20-кратный избыток цистеина добавляли поверх линкера-лекарственного средства для гашения реакции. И наконец, продукт ADC очищали путем элюирования на Sephadex G-25, уравновешенном в PBS, и концентрировали путем центрифужной ультрафильтрации. Конъюгат фильтровали через 0,2 мкм-фильтр в стерильных условиях и хранили при -80°C для анализа и тестирования. Отношение антител к лекарственному средству анализировали с помощью УФ-спектрометрии, содержание мономеров оценивали с помощью ЭХ-ВЭЖХ, а содержание свободного лекарственного средства оценивали с помощью ОФ-ВЭЖХ. DAR для антител, конъюгированных с vcMMAE, показаны в табл. 8.

Таблица 8

DAR для антител, конъюгированных с vcMMAE

Антитела	DAR
4F11E2 HC N55E-LC S32A	3,76
72C1B6A3 HC WT-LC S32A	3,93
IMAV362 (эталонное Ab)	4,00
IgG1 (контроль)	3,81

Пример 21. Относительная аффинность и специфичность связывания "оголенных" антител против CLDN18.2 и конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В этом примере определяли относительную аффинность и специфичность связывания "оголенных" антител против CLDN18.2 и конъюгатов антитело-лекарственное средство с помощью проточной цитометрии с использованием клеточных линий, позитивных и негативных по CLDN18.2.

Клетки из экспоненциально растущей культуры собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA

(Gibco, 25300-054) и подсчитывали с использованием камеры для подсчета клеток Нойбауэра. Клетки центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. (468×g), супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в буфере для FACS (PBS, содержащем 2% FCS (Gibco, 10270-106) для анализа на антитела, конъюгированные с токсином; PBS, содержащем 2% FCS и 2 мМ EDTA для скрининга на "оголенные" антитела, реагирующие с CLDN18.2) при  $2 \times 10^6$  клеток/мл. 100 мкл клеточной суспензии на лунку (соответствующей  $2 \times 10^5$  клеток/лунку) переносили в круглодонный 96-луночный микротитрационный планшет. После центрифугирования в течение 1 мин при 1500 об/мин, супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем конъюгированные с токсином или "оголенные" антитела в соответствующих концентрациях (до 20 мкг/мл для измерения относительной аффинности или 50 мкг/мл для регуляции экспрессии) и инкубировали в течение 30-45 мин при 4°C (табл. 8). Клетки центрифугировали в течение 1 мин при 1500 об/мин и супернатант удаляли. После того, как клетки трижды промывали буфером для FACS, их ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем APC-конъюгированное антитело против человеческих IgG (Jackson Immuno Research, 109-136-170) или APC-конъюгированное козье антитело против мышиных IgG (Jackson Immuno Research, 115-136-146) или белок L-ФИТЦ (1 мкг/мл, для химического анализа mAB294) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C (табл. 3). После инкубирования, к каждому образцу добавляли по 100 мкл буфера для FACS, клетки центрифугировали в течение 1 мин при 1500 об/мин и супернатант отбрасывали. Стадию промывки буфером для FACS повторяли дважды. И наконец, клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS и связывание определяли с помощью биоанализатора массивов для BD FACS.

Следует отметить, что конъюгированные с токсином и "оголенные" антитела использовали в равных концентрациях. Результаты показаны на фиг. 24.

Пример 22. Клеточная токсичность гуманизованных антител против клаудина 18.2, конъюгированных с ММАЕ, является более сильной, чем для IMAV362, конъюгированного с ММАЕ, в трансфектантах DAN-G, NUGC или SCG-7901.

Клетки, сверхэкспрессирующие человеческий клаудин 18.2 (трансфектанты DAN-G, NUGC или SCG-7901), собирали с использованием 0,05% трипсина/EDTA (Gibco, 25300-054), ресуспендировали в среде для культивирования клеток и 50 мкл клеточной суспензии с соответствующим количеством клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток. Через 24 ч добавляли конъюгированные с токсином IMAV362 или контрольные антитела, разведенные в 50 мкл среды в соответствующих концентрациях, и клетки культивировали еще 72 ч. Влияние гуманизованных антител против клаудина 18.2, конъюгированных с ММАЕ, на жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа на жизнеспособность клеток CellTiter-Glo® (G7572).

Протокол люминесцентного анализа на жизнеспособность клеток CellTiter-Glo® (G7572) приводится ниже:

1. Подготовка многолуночных планшетов с непрозрачными стенками, содержащих клетки млекопитающих в культуральной среде, по 100 мкл на лунку для 96-луночных планшетов или по 25 мкл на лунку для 384-луночных планшетов. Многолуночные планшеты должны быть совместимы с используемым люминометром.

2. Подготовка контрольных лунок со средой без клеток для получения значения фоновой люминесценции.

3. Добавление тестируемого соединения в экспериментальные лунки и инкубирование в соответствии с протоколом культивирования.

4. Уравновешивание планшета и его содержимого при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин.

5. Добавление объема реагента CellTiter-Glo®, равного объему среды для культивирования клеток, присутствующей в каждой лунке (например, добавление 100 мкл реагента к 100 мкл среды, содержащей клетки для 96-луночного планшета, или добавление 25 мкл реагента к 25 мкл среды, содержащей клетки, для 384-луночного планшета).

6. Смешивание содержимого в течение 2 мин на орбитальном шейкере для индуцирования лизиса клеток.

7. Инкубирование планшета при комнатной температуре в течение 10 мин для стабилизации люминесцентного сигнала. Примечание: Неравномерный люминесцентный сигнал в стандартных планшетах может быть вызван температурными градиентами, неравномерным посевом клеток или побочными эффектами в многолуночных планшетах.

8. Запись данных люминесценции.

Результаты испытаний показаны на фиг. 25А-С. Оба BG2001-С и BG2001-D при их конъюгировании с ММАЕ обладали значительно повышенной цитотоксичностью по сравнению с эталонным конъюгатом IMAV362-NMAE во всех протестированных клетках. Таким образом, эти результаты продемонстрировали улучшенную способность раскрытых здесь антител интернализировать конъюгированные лекарственные средства.

Пример 23. Клеточная токсичность гуманизованных антител против клаудина 18.2, конъюгирован-

ных с ММАЕ, является более сильной, чем для IMAV362, конъюгированного с ММАЕ, в SNU620, эндогенно экспрессирующих человеческий клаудин 18.2.

Клетки SNU620 ресуспендировали в среде для культивирования клеток и высевали 50 мкл суспензии клеток с соответствующим количеством клеток на лунку в 96-луночные планшеты для культивирования клеток. Через 24 ч добавляли антитела, конъюгированные с токсином, включая эталонное антитело IMAV362, разведенные в 50 мкл среды в соответствующих концентрациях, и клетки культивировали еще 72 ч. Влияние гуманизованных антител против клаудина 18.2, конъюгированных с ММАЕ, на жизнеспособность клеток определяли с помощью люминесцентного анализа на жизнеспособность клеток CellTiter-Glo® (G7572). Как показано на фиг. 26, BG2001-C и BG2001-D были намного более эффективными в отношении доставки конъюгированного ММАЕ в клетки SNU620 по сравнению с эталонным антителом IMAV362, то есть, основным антителом против клаудина 18.2, находящимся на стадии клинической разработки.

Пример 24. Эффективность *in vivo* конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В этом примере тестировали эффективность одного из конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) по сравнению с отдельно взятым антителом (mAb) в отношении снижения роста опухоли у "голых" мышей, которым трансплантировали опухолевые клетки человека.

0,1 мл ( $5 \times 10^5$  клеток) клеток, взятых у человека (смешанных с матригелем 1:1), подкожно инокулировали в правую часть спинки каждой мыши. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 60-80 мм<sup>3</sup>, для лечебных экспериментов отбирали 30 мышей.

Через 18 дней после инокуляции, для каждой обработки отбирали 5 мышей с опухолью размером в диапазоне 330-520 мм<sup>3</sup> (1 мг/кг, 3 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг ADC, QW), и эту обработку проводили три недели. Для сравнения, обработка только одним антителом (mAb) проводилась в дозе 10 мг/кг (BIW).

Результаты представлены на фиг. 27. ADC в дозе 10 мг/кг и в дозе 20 мг/кг полностью подавлял рост опухоли без снижения массы тела животных. На фиг. 28 показан средний и индивидуальный эффект уменьшения опухоли у каждого животного. Таким образом, эффект ADC по уменьшению объема опухоли был значительно выше, чем эффект, достигаемый с использованием одного антитела.

Настоящее изобретение не рассматривается как ограничение объема, представленного конкретно описанными вариантами его осуществления, которые приводятся лишь в качестве отдельных иллюстраций отдельных аспектов раскрытия изобретения, и в объем настоящего изобретения входят любые композиции или способы, которые функционально эквивалентны этим композициям и способам. Специалистам в данной области будет очевидно, что в способы и композиции согласно изобретению могут быть внесены различные модификации и изменения, не выходящие за рамки существа или объема изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение охватывает модификации и варианты его раскрытия при условии, что они будут входить в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно включена посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий фрагмент лекарственного средства, ковалентно присоединенный к антителу или его фрагменту, обладающему специфичностью связывания с человеческим белком клаудином 18.2 (CLDN18.2) дикого типа, где антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, включающую комплементарность-определяющие области легкой цепи CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и переменную область тяжелой цепи, включающую комплементарность-определяющие области тяжелой цепи CDRH1, CDRH2 и CDRH3, где

(a) CDRL1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304,

CDRL2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229;

CDRL3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

CDRH1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 242;

CDRH2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263; и

CDRH3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 289;

(b) CDRL1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 309,

CDRL2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227,

CDRL3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

CDRH1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 246,

CDRH2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 311, и

CDRH3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 294; или

(c) CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304,

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227,

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 253,  
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, и  
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307,  
где указанный фрагмент лекарственного средства представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ).

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело или его фрагмент присоединены к 2-10 фрагментам лекарственного средства.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело или его фрагмент присоединены к 2-6 фрагментам лекарственного средства.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его фрагмент не связывается с  $\beta 1$  и  $\beta 2$  CLDN18.2 или связывается с  $\beta 1$  или  $\beta 2$  с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз ниже, чем аффинность связывания с петлей  $\beta 3$ - $\beta 4$  или с цепью  $\beta 5$  CLDN18.2.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его фрагмент не связывается с белком CLDN18.1 или связывается с белком CLDN18.1 с аффинностью, которая по меньшей мере в 10 раз ниже, чем аффинность связывания с белком CLDN18.2.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его фрагмент связывается по меньшей мере с аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 и E62, и по меньшей мере с аминокислотным остатком, выбранным из группы, состоящей из Y169 и G172 SEQ ID NO: 30.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%, и вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181 или пептид, идентичный ей по последовательности по меньшей мере на 90%.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело или его фрагмент является гуманизированным.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело или его фрагмент содержит константную область тяжелой цепи.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где указанное антитело или его фрагмент содержит константную область легкой цепи.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.12, где указанная константная область легкой цепи содержит константный домен каппа или константный домен лямбда.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где молекула лекарственного средства присоединена к антителу или его фрагменту посредством линкера.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.14, где линкер гидролизуеться в кислотных условиях.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.14, где указанный линкер содержит валинцитруллин (val-cit), фенилаланин-лизин (phe-lys), малеимидокапроновой кислоты-валина-цитрулина-п-аминобензилоксикарбонил (mc-Val-Cit-PABA), сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (smcc) или maleimidocaproyl (mc).

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где отношение монометилауристатина E (ММАЕ) к антителу или его фрагменту составляет от 1:1 до 20:1.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где отношение монометилауристатина E (ММАЕ) к антителу или его фрагменту составляет от 2:1 до 6:1.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где отношение монометилауристатина E (ММАЕ) к антителу или его фрагменту составляет приблизительно 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1 или 5:1.

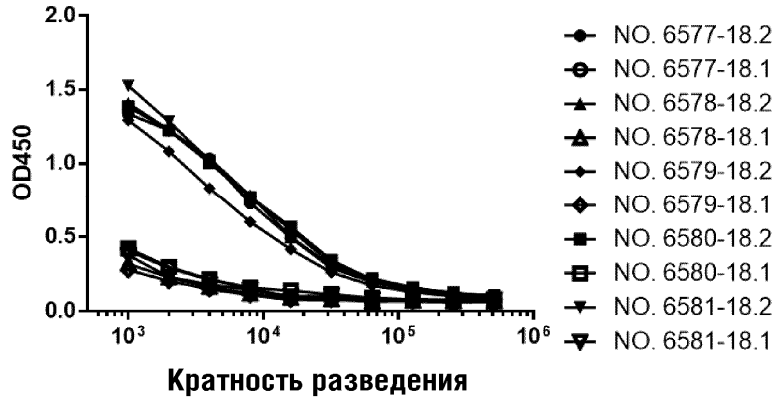
20. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение пациенту конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-19.

21. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-19 в целях получения лекарственного средства для лечения рака.

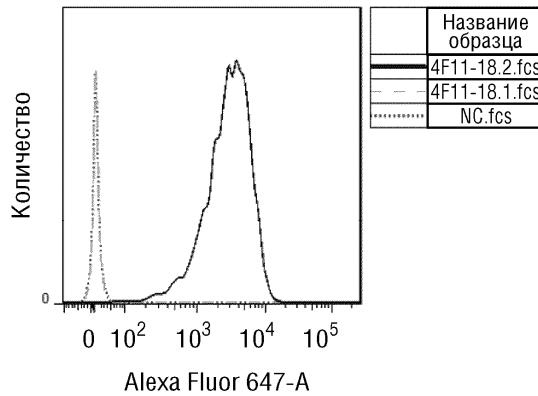
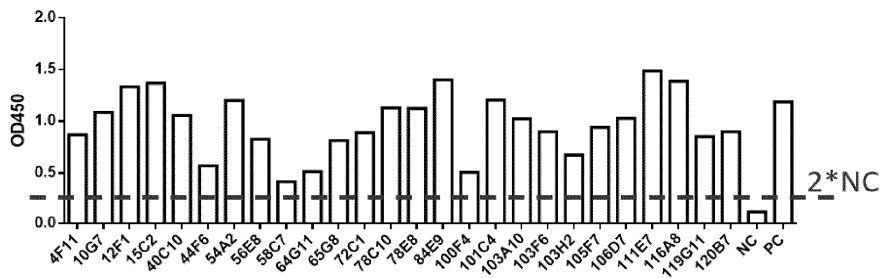
22. Способ по п.20 или применение по п.21, где рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

23. Способ по п.20 или применение по п.21, где рак представляет собой рак желудка.

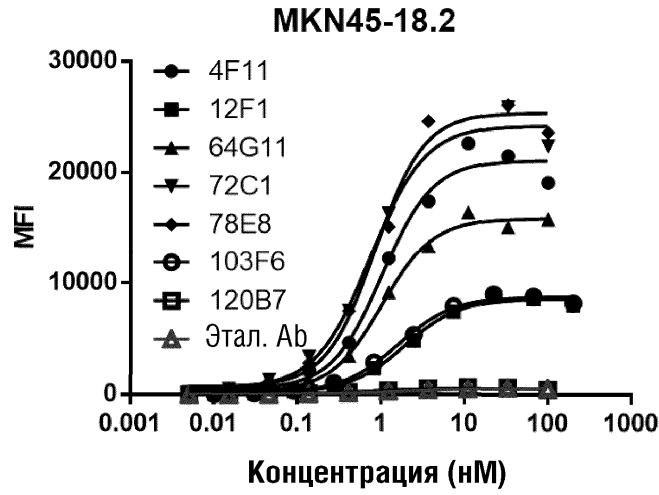
24. Способ по п.20 или применение по п.21, где у пациента имеется мутант M149L белка CLDN18.2.



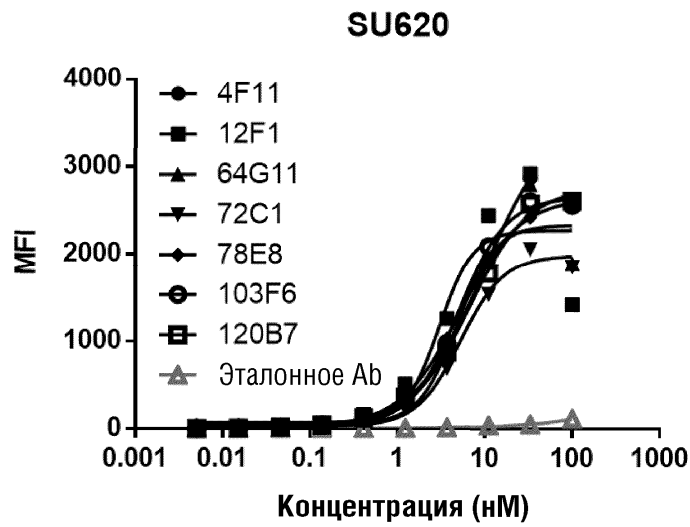
Фиг. 1



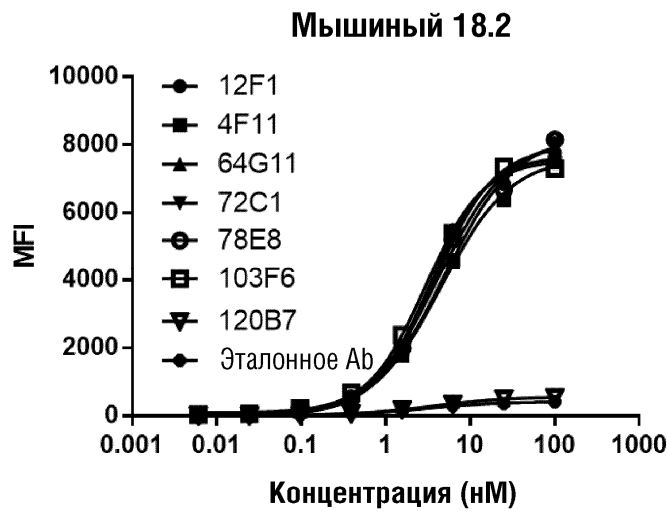
Фиг. 2



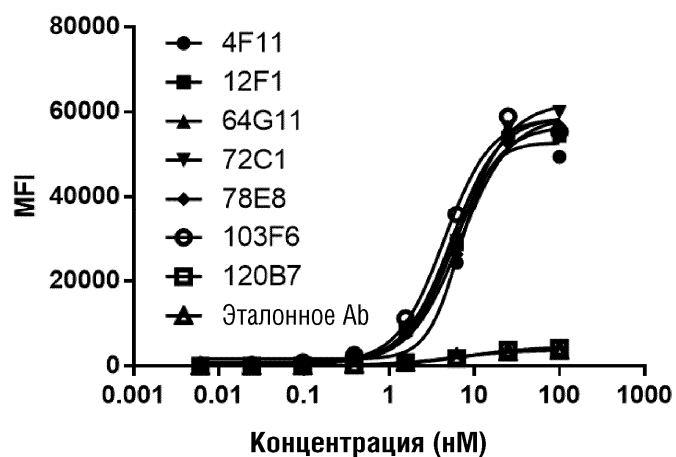
Фиг. 3



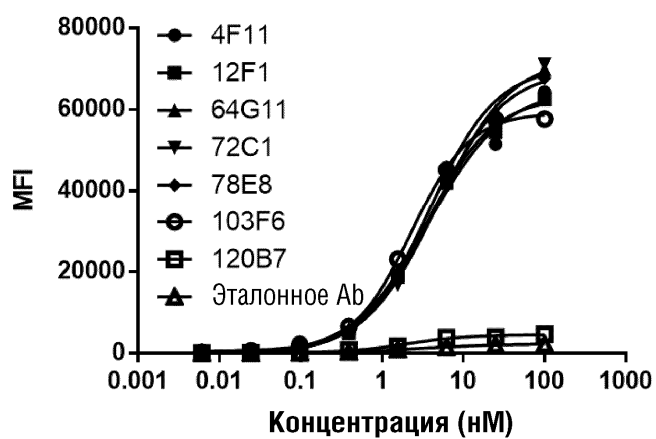
Фиг. 4



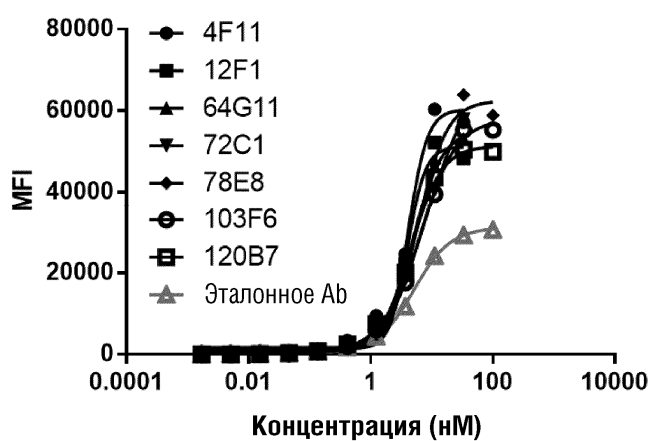
Фиг. 5

**Мышиный 18.2**

Фиг. 6

**Человеческий 18.2**

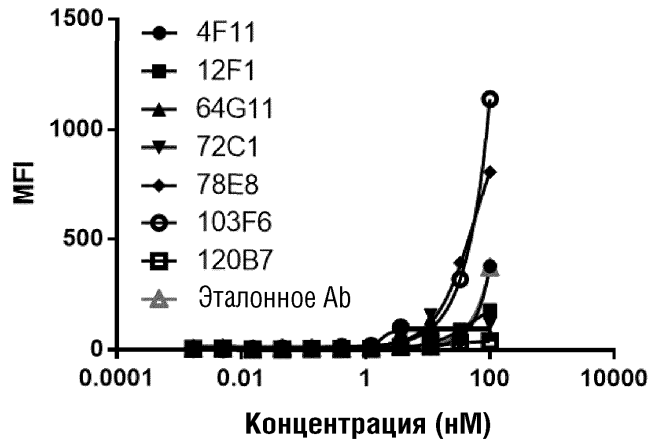
Фиг. 7

**МКН45-18.2**

Фиг. 8

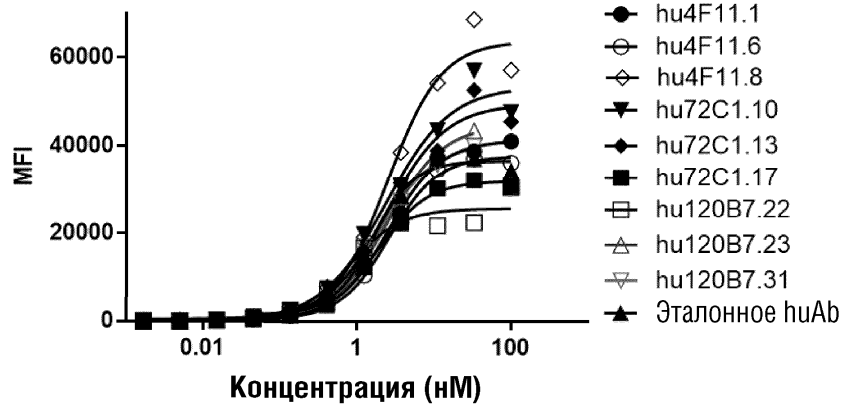


**МКН45-18.1**



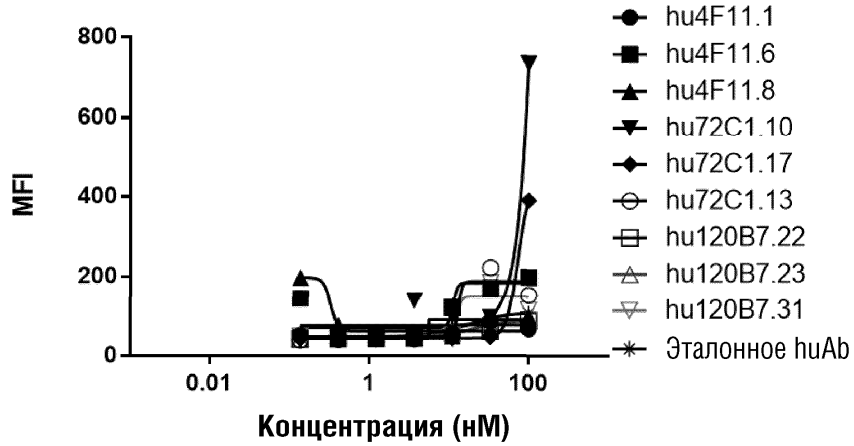
Фиг. 9

**МКН45-18.2**

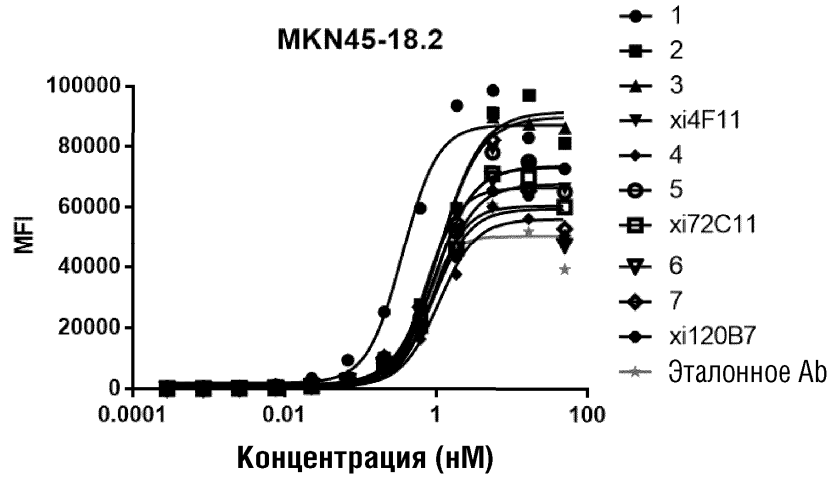


Фиг. 10

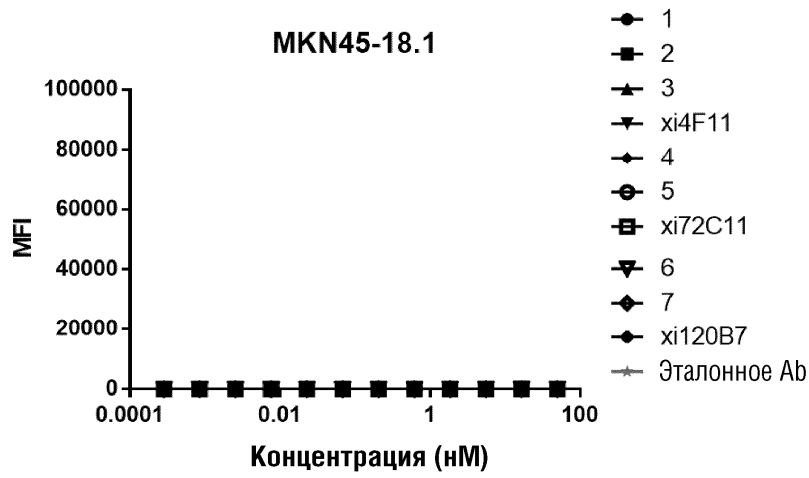
**МКН45-18.1**



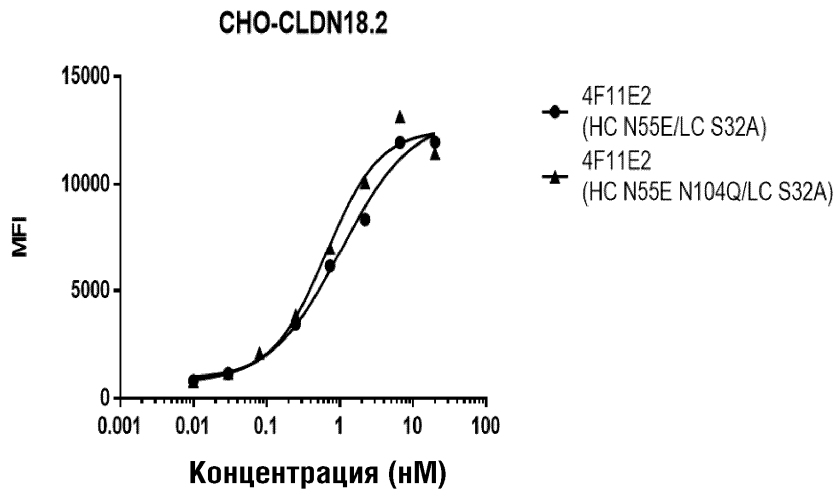
Фиг. 11



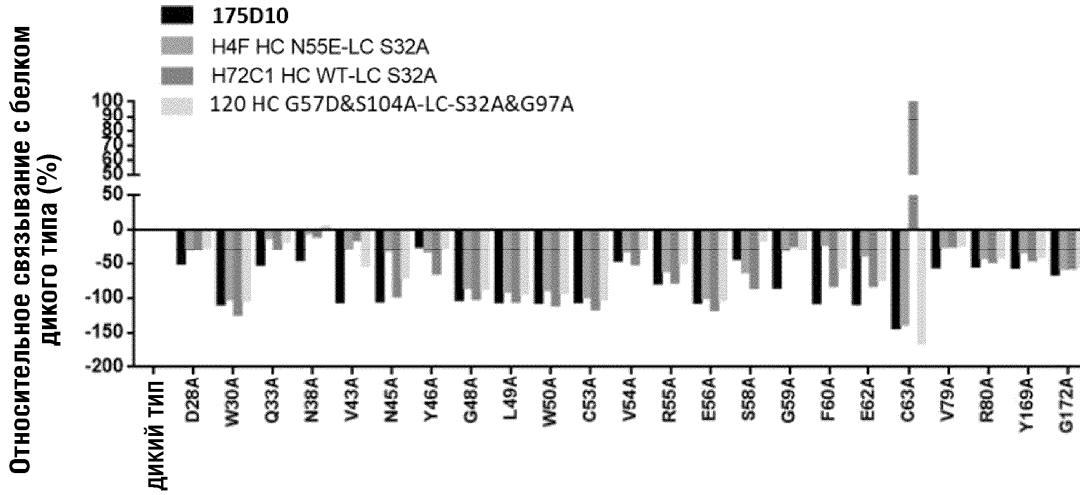
Фиг. 12



Фиг. 13

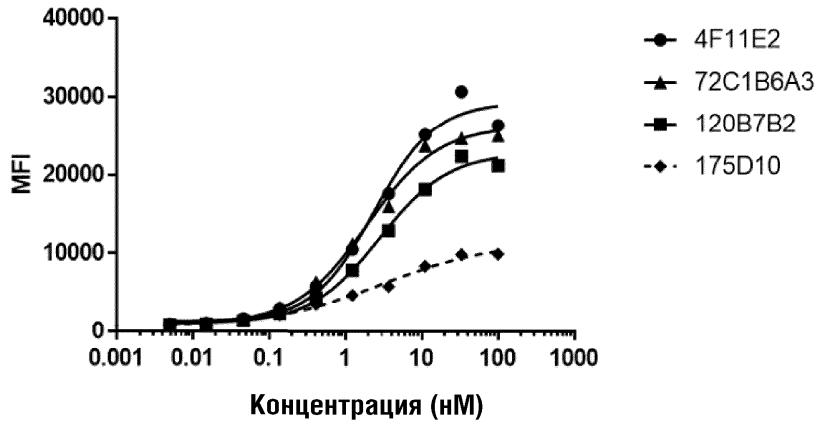


Фиг. 14

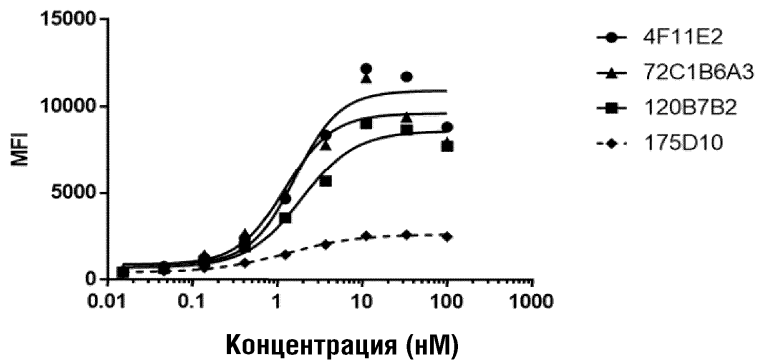


Фиг. 15

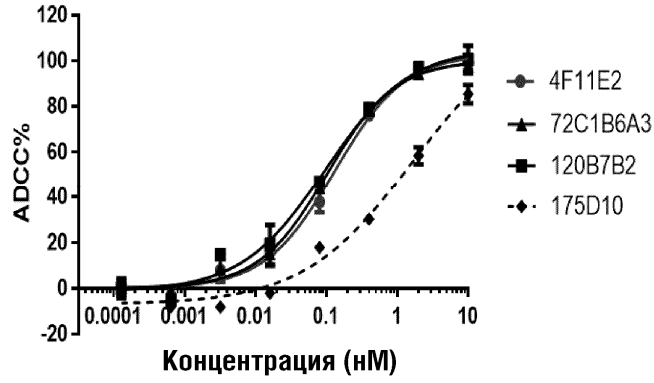
**Высокий уровень CHO-K1-C18.2**



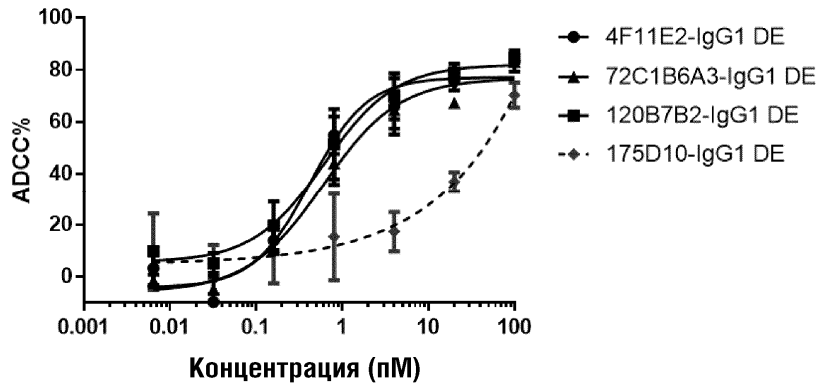
**Низкий уровень CHO-K1-C18.2**



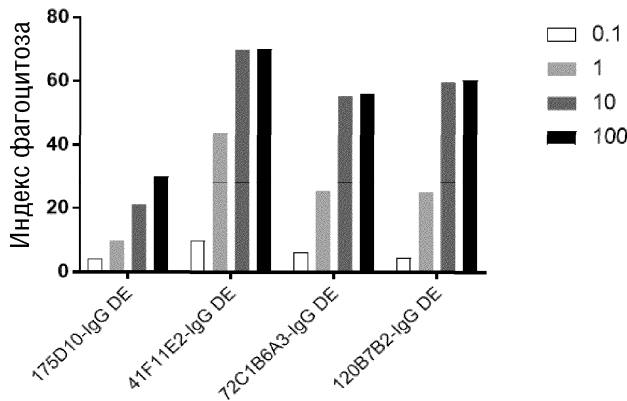
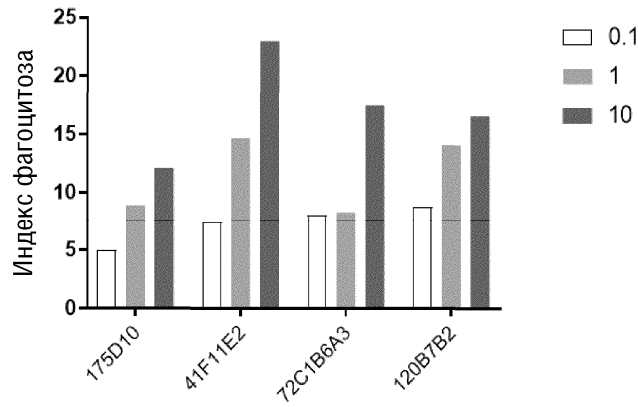
Фиг. 16



Фиг. 17

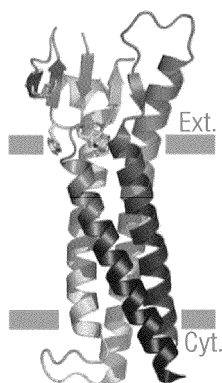


Фиг. 18

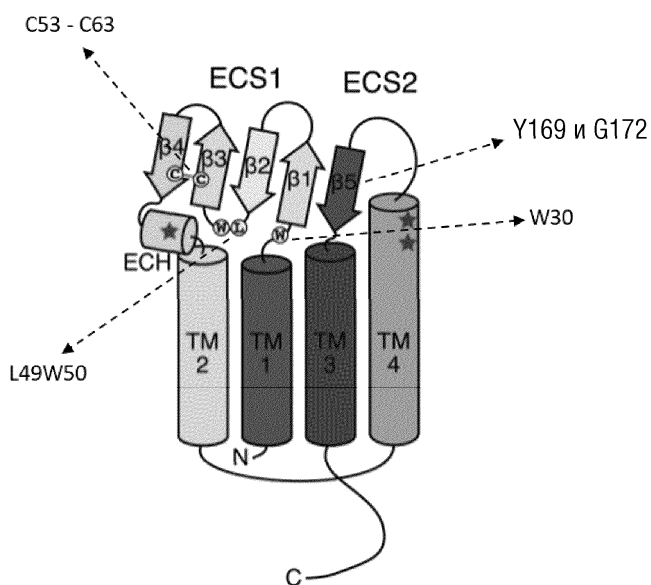


Фиг. 19

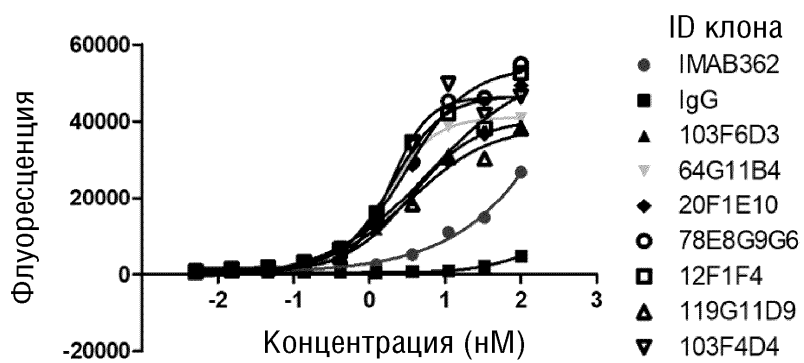
**A**



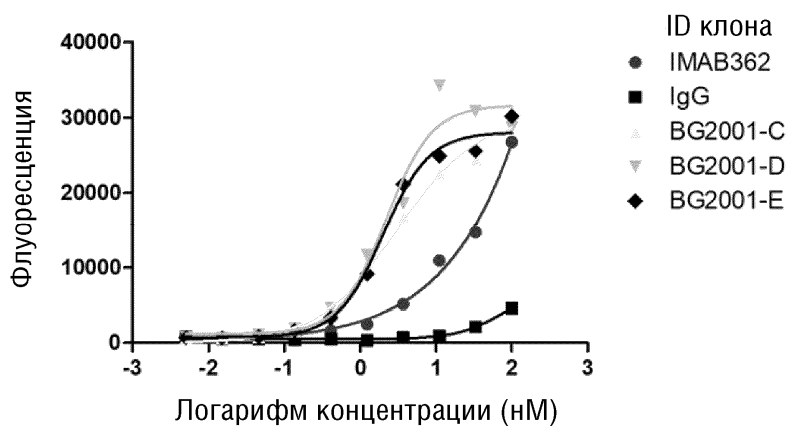
**B**



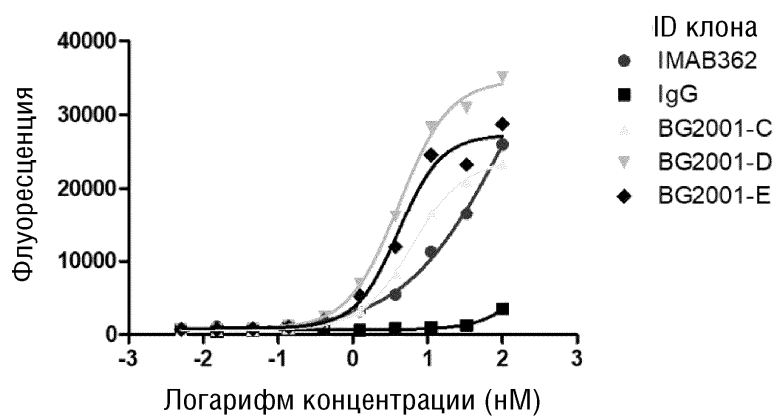
Фиг. 20



Фиг. 21

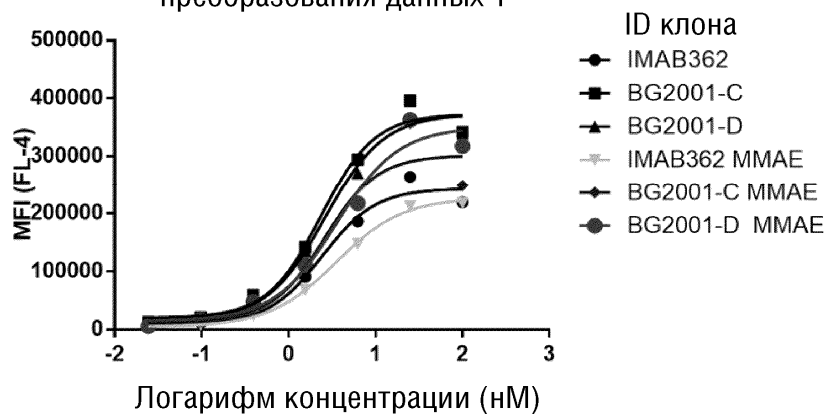


Фиг. 22

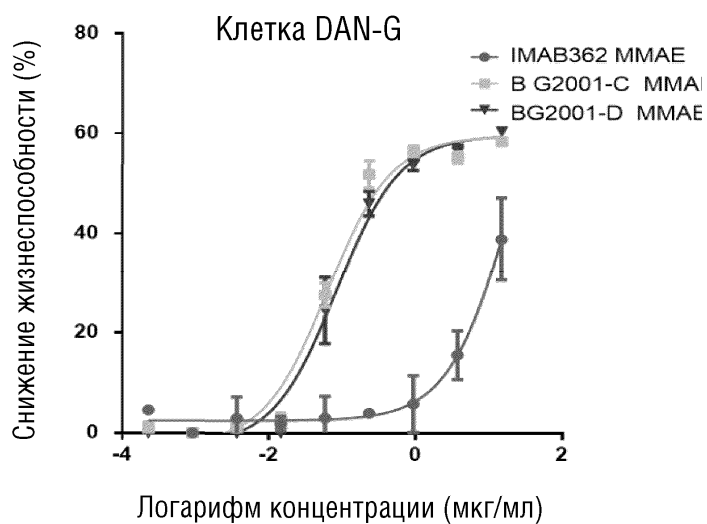


Фиг. 23

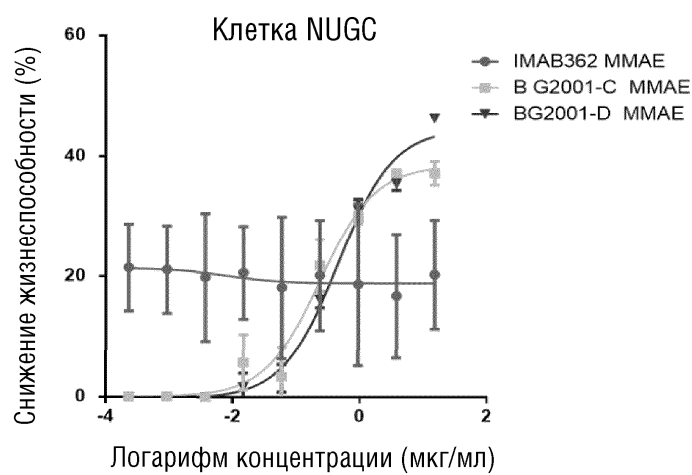
Кривая: нелинейный график  
преобразования данных 1



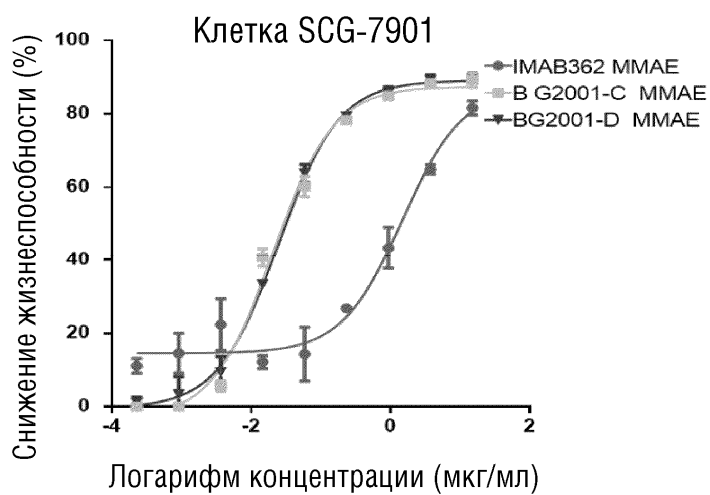
Фиг. 24



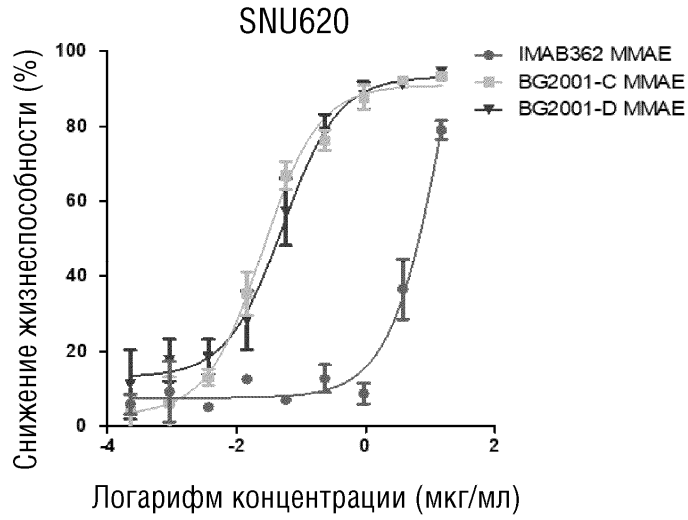
Фиг. 25А



Фиг. 25В

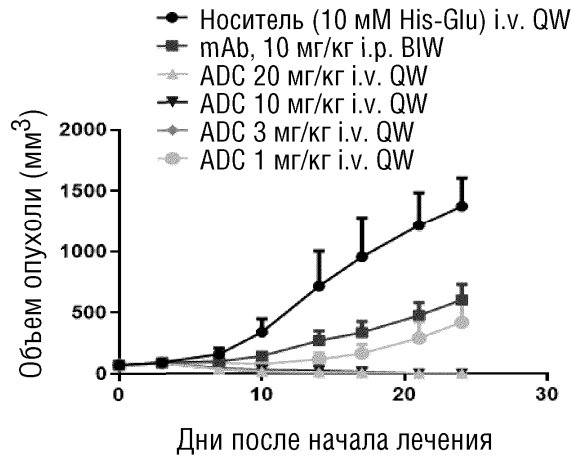


Фиг. 25С

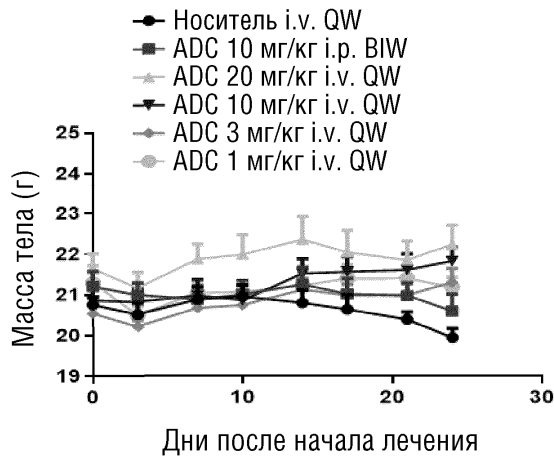


Фиг. 26

### Кривая роста опухоли



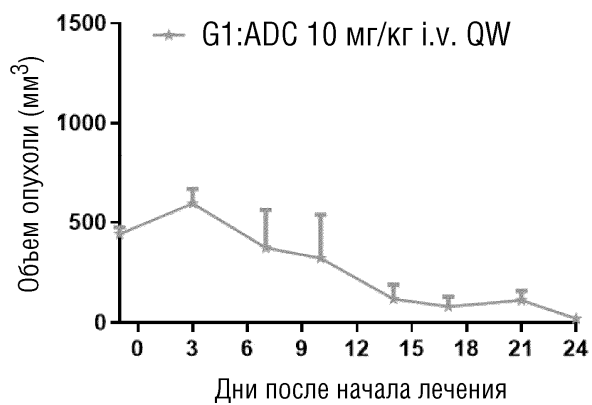
### Масса тела



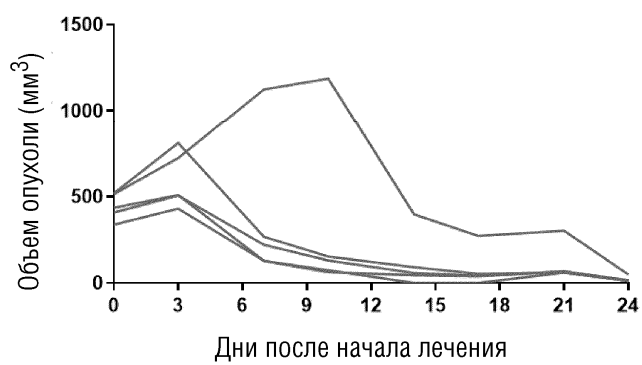
Фиг. 27



## Кривая роста опухоли



## Кривые роста отдельных опухолей



Фиг. 28

