

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391580 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.06

(22) Дата подачи заявки
2022.05.30

(51) Int. Cl. C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К CLDN18.2 И ИХ ВЕРСИИ СО
СКОНСТРУИРОВАННЫМ Fc

(31) PCT/CN2021/097239; PCT/
CN2021/097240; PCT/CN2021/106783;
PCT/CN2021/106784

(32) 2021.05.31; 2021.05.31; 2021.07.16;
2021.07.16

(33) CN

(86) PCT/CN2022/095839

(87) WO 2022/253154 2022.12.08

(71) Заявитель:
ШИЦЗЯЧЖУАН ИЛИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:
Цзя Чжэньхуа (CN)

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.,
Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)

(57) Предложена панель моноклональных антител, которые специфически связываются с CLDN18.2 (клаудин 18.2) и не связываются специфически с CLDN18.1 и необязательно имеют сконструированную Fc-область.

A1

202391580

202391580

A1

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К CLDN18.2 И ИХ ВЕРСИИ СО СКОНСТРУИРОВАННЫМ Fc

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент PCT № PCT/CN2021/097239 и PCT/CN2021/097240, поданных 31 мая 2021 года, и патентных заявках PCT № PCT/CN2021/106783 и PCT/CN2021/106784, поданных 16 июля 2021 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Предложена панель моноклональных антител, которые специфически связываются с CLDN18.2 (клаудин 18.2) и не связываются специфически с CLDN18.1, и необязательно имеют сконструированную Fc-область.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Молекула плотного контакта сплайс-варианта 2 клаудина 18 (клаудин 18.2, CLDN18.2) является членом семейства белков плотного контакта клаудина. CLDN18.2 представляет собой трансмембранный белок массой 27,8 кДа, содержащий четыре трансмембранных домена с двумя небольшими внеклеточными петлями.

В нормальных тканях не обнаружена экспрессия CLDN18.2 с помощью RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), за исключением желудка. Иммуногистохимия со специфическими антителами CLDN18.2 выявляет желудок как единственную положительную ткань.

CLDN18.2 представляет собой высокоселективный антиген желудочной линии, экспрессируемый исключительно на короткоживущих дифференцированных эпителиальных клетках желудка. CLDN18.2 сохраняется в процессе злокачественной трансформации и, таким образом, часто отображается на поверхности клеток рака желудка человека. Кроме того, этот пан-опухолевый антиген эктопически активируется на значительных уровнях при аденокарциномах пищевода, поджелудочной железы и легких. Белок CLDN18.2 также локализуется в метастазах аденокарцином желудка в лимфатических узлах и в отдаленных метастазах, особенно в яичнике (так называемые опухоли Крукенберга).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение предлагает антитела к CLDN18.2.

Изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности сконструированным Fc, специфически связывающееся с CLDN18.2 человека, где антитело содержит

(1) HVR-H1 (гипервариабельная область 1 тяжелой цепи), HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH (вариабельная область тяжелой цепи), представленной в SEQ ID NO: 1, и HVR-L1 (гипервариабельная область 1 легкой цепи), HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL (вариабельная область легкой цепи), представленной в SEQ ID NO: 2;

(2) HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH, представленной в SEQ ID NO: 3, и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL, представленной в SEQ ID NO: 4;

(3) HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH, представленной в SEQ ID NO: 5, и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL, представленной в SEQ ID NO: 6; или

(4) HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH, представленной в SEQ ID NO: 7, и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL, представленной в SEQ ID NO: 8,

например, представленной на фиг. 1A, 1B, 1C или 1D, и

необязательно содержит одну или более мутаций в Fc-области.

В одном варианте осуществления антитело содержит

(1) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 11, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 12, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 13, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 14, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 15, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 16;

(2) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 17, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 18, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 19, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 20, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 21, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 22;

(3) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 23, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 24, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 25, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 26, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 27, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 28; или

(4) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 29, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 30, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 31, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 32, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 33, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления антитело содержит

(1) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 41, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 42, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 43, HVR-L1, представленную в SEQ ID

NO: 44, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 45, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 46;

(2) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 47, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 48, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 49, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 50, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 51, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 52; или

(3) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 53, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 54, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 55, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 56, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 57, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 58.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности, со сконструированным Fc, специфически связывающееся с CLDN18.2 человека, где антитело содержит

(1) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 11, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 12, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 14, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 15, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 16;

(2) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 17, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 18, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 19, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 20, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 21, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 22;

(3) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 23, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 24, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 25, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 26, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 27, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 28; или

(4) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 29, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 30, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 31, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 32, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 33, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 34, и

необязательно содержит одну или более мутаций в Fc-области.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности, со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит

(1) VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 41, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 42, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 43, и VL,

содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 44, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 45, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 46;

(2) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 47, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 48, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 49, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 50, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 51, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 52; или

(3) VH, содержащую HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 53, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 54, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 55, и VL, содержащую HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 56, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 57, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 58, и,

необязательно, содержащую одну или более мутаций в Fc-области.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности, со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит

(1) VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, представленную в SEQ ID NO: 2;

(2) VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4;

(3) VH, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, представленную в SEQ ID NO: 6; или

(4) VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8, и

необязательно содержит одну или более мутаций в Fc-области,

необязательно, где первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более мутаций, которые модифицируют, например, увеличивают или уменьшают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, например, ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность). В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L. В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

Настоящее изобретение дополнительно предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело:

i) конкурирует за связывание с CLDN18.2 человека с антителом к CLDN18.2, содержащим (1) VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, представленную в SEQ ID NO: 2; (2) VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4; (3) VH,

представленную в SEQ ID NO: 5 и VL, представленную в SEQ ID NO: 6; или (4) VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8, и/или

ii) связывается с тем же эпитопом на CLDN18.2 человека, что и антитело к CLDN18.2, содержащее (1) VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, представленную в SEQ ID NO: 2; (2) VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4; (3) VH, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, представленную в SEQ ID NO: 6; или (4) VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8; и/или

iii) опосредует ADCC PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) на клетках (например, клетках 293Т или клетках CHO или клетках СТ26 или клетках КАТОШ (клетки рака желудка человека) или клетках NCI-N87), которые экспрессируют человеческий CLDN18.2, например, со значением EC50 (полумаксимальная эффективная концентрация) около или менее 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,09 нМ, 0,08 нМ, 0,07 нМ, 0,06 нМ, 0,05 нМ, 0,04 нМ, 0,03 нМ, 0,02 нМ, 0,01 нМ, 0,009 нМ, 0,008 нМ, 0,007 нМ, 0,006 нМ, 0,005 нМ, 0,004 нМ, 0,003 нМ, 0,002 нМ или 0,001 нМ, например, определяли с помощью LDH (лактатдегидрокиназа) или FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией); и/или

iv) не опосредует ADCC PBMC на клетках (например, клетках 293Т или клетках CHO (клетки яичника китайского хомячка) или клетках СТ26 или клетках КАТОШ или клетках NCI-N87), которые экспрессируют человеческий CLDN18.1; и/или

v) опосредует CDC на клетках (например, клетках 293Т или клетках CHO или клетках СТ26 или клетках КАТОШ или клетках NCI-N87), которые экспрессируют человеческий CLDN18.2, например, со значением EC50 около или менее 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ, 0,09 нМ, 0,08 нМ, 0,07 нМ, 0,06 нМ, 0,05 нМ, 0,04 нМ, 0,03 нМ, 0,02 нМ, 0,01 нМ, 0,009 нМ, 0,008 нМ, 0,007 нМ, 0,006 нМ, 0,005 нМ, 0,004 нМ, 0,003 нМ, 0,002 нМ или 0,001 нМ, например, определенное с помощью LDH или FACS; и/или

vi) не опосредует CDC на клетках (например, клетках 293Т или клетках CHO или клетках СТ26 или клетках КАТОШ или NCI-N87 клетки), которые экспрессируют CLDN18.1 человека; и/или

vii) связывается с клетками (например, клетками 293Т или клетками CHO), которые экспрессируют CLDN18.2 человека на клеточной поверхности, например, со значением Kd (константа диссоциации) при, около или менее 50 пМ, 45 пМ, 40 пМ, 38,6 пМ, 35 пМ, 30 пМ, 25 пМ, 20 пМ, 15 пМ, 13,1 пМ, 10 пМ, 9,5 пМ, 9 пМ или 5 пМ; и/или

viii) не связывается с клетками (например, клетками 293Т или клетками CHO), которые экспрессируют CLDN18.1 человека на клеточной поверхности; и/или

ix) специфически связываются с CLDN18.2 человека, например, со значением Kd при, около или менее 10 нМ, 9,5 нМ, 9 нМ, 8,5 нМ, 8 нМ, 7,5 нМ, 7 нМ, 6,5 нМ, 6,4 нМ, 6 нМ, 5,5 нМ, 5 нМ, 4,5 нМ, 4 нМ, 3,8 нМ, 3,5 нМ, 3 нМ, 2,5 нМ, 2 нМ, 1,7 нМ, 1,5 нМ или 1 нМ; и/или

x) специфически не связываются с CLDN18.1 человека.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой мышиное, химерное или гуманизованное антитело.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, необязательно выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента scFv и диатела.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 согласно изобретению представляет собой полноразмерное антитело. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит мутированную константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит константную область легкой цепи каппа человека, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой химерное антитело, например, химерное антитело мыши/человека. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению имеет сконструированный Fc.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело (mAb) или Fab-фрагмент по настоящему изобретению имеет формат кроссовера (x-mAb или x-Fab), где происходит обмен либо переменными доменами, либо (первыми) константными доменами легкой и тяжелой цепей.

Настоящее изобретение предлагает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело по изобретению. Настоящее изобретение предлагает вектор, например, вектор клонирования или вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Настоящее изобретение предлагает клетку-хозяина, содержащая нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению или

вектор по настоящему изобретению. Настоящее изобретение предлагает способ получения моноклонального антитела по изобретению, включающий культивирование клетки-хозяина с получением антитела. В одном варианте осуществления способ дополнительно включает выделение антитела из клетки-хозяина или культуры клеток.

Настоящее изобретение предлагает композицию, содержащую моноклональное антитело по настоящему изобретению. Настоящее изобретение предлагает фармацевтический состав, содержащий моноклональное антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение предлагает моноклональное антитело по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Настоящее изобретение предлагает моноклональное антитело по изобретению для применения в лечении рака. Настоящее изобретение предлагает применение моноклонального антитела по изобретению в производстве лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения рака. Настоящее изобретение предлагает способ лечения индивидуума, страдающего раком, включающий введение индивидууму эффективного количества моноклонального антитела по изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL антител по настоящему изобретению, где последовательности HVR по Кабату выделены затемнением.

На фиг. 1В показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL антител по настоящему изобретению, где последовательности HVR по IMGT (база данных ImMunoGeneTics) выделены затемнением.

На фиг. 1С показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL антител по настоящему изобретению, где последовательности HVR по Чотиа выделены затемнением.

На фиг. 1D показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL антител по настоящему изобретению, где последовательности HVR по Контакту выделены затемнением.

На фиг. 2 показано связывание антител по настоящему изобретению с клетками, экспрессирующими CLDN18.2.

На фиг. 3 показано связывание антител по настоящему изобретению с клетками, экспрессирующими CLDN18.1.

На фиг. 4 показана ADCC на клетках, экспрессирующих CLDN18.2, опосредованных антителами по настоящему изобретению.

На фиг. 5 показана кривая связывания антител по настоящему изобретению с huCLDN18.2.

На фиг. 6 показана кривая связывания антител по настоящему изобретению с клетками, экспрессирующими huCLDN18.2.

На фиг. 7 показаны результаты анализа ADCC антител по настоящему изобретению.

На фиг. 8 показаны результаты анализа клеточного связывания антител по настоящему изобретению.

На фиг. 9 показаны результаты анализа CDC антител по настоящему изобретению.

На фиг. 10 показаны результаты анализа ADCC антител по настоящему изобретению.

На фиг. 11 показан эффект CDC на CT26, экспрессирующих CLDN18.2, опосредованной антителами по настоящему изобретению, определенной с помощью анализа LDH.

На фиг. 12 показан эффект CDC на КАТОШ, экспрессирующих CLDN18.2, опосредованной антителами по настоящему изобретению, определенной с помощью анализа LDH.

На фиг. 13 показан эффект ADCC на КАТОШ, экспрессирующих CLDN18.2, опосредованной антителами по настоящему изобретению, определенной с помощью анализа LDH.

На фиг. 14 показан эффект ADCC на NCI-N87, экспрессирующих CLDN18.2, опосредованной антителами по настоящему изобретению, определенной с помощью анализа LDH.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную антиген-связывающую активность, но не ограничивается ими.

«Фрагмент антитела» относится к молекуле, не являющейся интактным антителом, но содержащей фрагмент интактного антитела, связывающего антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂-фрагменты; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных

антител (например, scFv); и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, но не ограничиваются ими.

Термин «химерное» антитело относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или вида животного, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника или вида животного.

«Класс» антитела относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Легкая цепь может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

«Эффекторные функции» относятся к биологической активности, приписываемой Fc-области антитела и зависящей от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC); связывание с рецептором Fc; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов поверхности клетки (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток.

Как используется в настоящем изобретении, термины «конструирование, сконструированный, инженерия» включают любые манипуляции с пептидным остовом или посттрансляционные модификации встречающегося в природе или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Конструирование включает модификации аминокислотной последовательности, паттерна гликозилирования или группы боковой цепи отдельных аминокислот, а также комбинации этих подходов.

Термин «Fc-область» в настоящем документе используется для обозначения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере фрагмент константной области. Этот термин включает нативную последовательность Fc-области и варианты Fc-области. В одном варианте осуществления Fc-область тяжелой цепи IgG человека располагается на отрезке от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Тем не менее, C-концевой участок лизина (Lys447) Fc-области может присутствовать или не присутствовать. В одном варианте осуществления антитело к CLDN18.2, как описано в настоящем описании, имеет изотип IgG1 и содержит константную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления

антитело дополнительно содержит С-концевой лизин (Lys447). Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации, принятой в EU (Евросоюз), также называемой EU-индексом, описанной в работе Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

«Каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, за исключением остатков гипервариабельной области (HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех FR-доменов: FR1, FR2, FR3 и FR4. Соответственно, последовательности HVR и FR в VH (или VL) обычно располагаются в следующей последовательности: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» в настоящем документе являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу, структура которого практически аналогична структуре нативного антитела, или которое содержит тяжелые цепи, содержащие Fc-область.

Термины "клетка-хозяин", "линия клеток-хозяев" и "культура клеток-хозяев" используются как взаимозаменяемые и относятся к клеткам, в которые ввели экзогенную нуклеиновую кислоту, включая потомство таких клеток. Клетки-хозяева включают "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки и потомство, происходящее от них, независимо от количества пассажей. Потомство может не быть полностью идентичным по содержанию нуклеиновых кислот родительской клетке, но может содержать мутации. Это определение включает мутантное потомство, обладающее той же функцией или биологической активностью, которая наблюдается во время скрининга или отбирается из первоначально трансформированных клеток.

"Гуманизированное" антитело относится к химерному антителу, содержащему аминокислотные остатки из нечеловеческой HVR и аминокислотные остатки из FR человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного, и обычно - двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все HVR (например, CDR (область, определяющая комплементарность)) соответствуют аналогичным участкам из антитела нечеловеческого происхождения, и все или практически все FR-области соответствуют последовательности антитела человека. В некоторых случаях гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере фрагмент константной области антитела, полученный из антитела человека. "Гуманизированная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, подвергнутому гуманизации.

В данном контексте термин "гипервариабельная область" или "HVR" относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, обладающих гипервариабельными последовательностями ("определяющие комплементарность области" или "CDR") и/или образующих структурно определенные петли ("гипервариабельные петли") и/или содержащих остатки, контактирующие с антигеном ("антигенные контакты"). Как правило, антитела содержат шесть HVR, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Иллюстративные HVR в настоящем документе включают:

(a) гипервариабельные петли, встречающиеся в аминокислотных остатках 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) CDR, встречающиеся в аминокислотных остатках 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) контакты антигена, происходящие с аминокислотными остатками 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) и 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996));

(d) комбинации (a), (b) и/или (c), включая HVR-аминокислотные остатки 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) и 94-102 (H3).

Остатки HVR могут быть идентифицированы на веб-сайтах, например, <https://www.novopro.cn/tools/cdr.html>.

Если не указано иное, остатки HVR и другие остатки в вариабельном домене (например, FR-остатки) в настоящем документе нумеруют по Kabat et al., supra.

Термин "моноклональное антитело" в данном контексте относится к антителу, полученному от популяции по существу однородных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих естественные мутации или возникающих по время продукции моноклонального антитела, причем такие варианты присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из по существу однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела

посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением можно получить за счет различных способов, включая гибридомный способ, методики рекомбинантных ДНК, методики фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, полностью или частично содержащих локусы иммуноглобулина человека, причем такие способы и другие типичные способы получения моноклональных антител описаны в настоящем документе, но не ограничиваясь ими.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, участвующему в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) нативного антитела обычно обладают аналогичной структурой, причем каждый домен содержит четыре консервативные каркасные области (FR) и три гипервариабельные области (HVR). См., например, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, связывающиеся с конкретным антигеном, можно выделить, используя VH- или VL-домен антитела, связывающегося с антигеном, для скрининга библиотеки комплементарных VL- или VH-доменов, соответственно. См., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термин «вектор» в настоящем документе относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной размножать другую нуклеиновую кислоту, с которой он связан. Этот термин включает вектор как самореплицирующуюся нуклеотидную структуру, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он внедрен. Некоторые векторы способны управлять экспрессией нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как «вектор экспрессии».

II. Примерные антитела

Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 11, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 12, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 13, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 14, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 15, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления указанное антитело содержит VH, представленную в SEQ ID NO: 1, и VL, представленную в SEQ ID NO: 2. Необязательно, первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 17, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 18, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 19, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 20, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 21, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 22. Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 41, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 42, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 43, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 44, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 45, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 46. Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 47, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 48, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 49, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 50, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 51, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 52. Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 53, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 54, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 55, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 56, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 57, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 58. В одном варианте осуществления указанное антитело содержит VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4. Необязательно, первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 23, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 24, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 25, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 26, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 27, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 28. В одном варианте осуществления указанное антитело содержит VH, представленную в SEQ ID NO: 5, и VL, представленную в SEQ ID NO: 6. Необязательно, первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

Настоящее изобретение предлагает выделенное моноклональное антитело, в частности со сконструированным Fc, которое специфически связывается с CLDN18.2 человека, где антитело содержит VH, содержащий HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 29, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 30, и HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 31, и VL, содержащий HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 32, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 33, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 34. В одном варианте осуществления указанное антитело содержит VH, представленную в SEQ ID NO: 7, и VL, представленную в SEQ ID NO: 8. Необязательно, первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более мутаций, модифицирующие, например, увеличивающие или уменьшающие связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, например, ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность). В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L. В одном варианте осуществления одна или более мутаций в Fc-области представляют собой L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой мышинное, химерное или гуманизированное антитело.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, необязательно выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента scFv и диатела.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 согласно изобретению представляет собой полноразмерное антитело. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит мутированную константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 40. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению содержит константную область легкой цепи каппа человека, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 10. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению представляет собой химерное антитело, например,

химерное антитело мыши/человека. В одном варианте осуществления моноклональное антитело к CLDN18.2 по изобретению имеет сконструированный Fc.

В одном варианте осуществления моноклональное антитело (mAb) или Fab-фрагмент по настоящему изобретению имеет формат кроссовера (x-mAb или x-Fab), где происходит обмен либо переменными доменами, либо (первыми) константными доменами легкой и тяжелой цепей.

III. Рекомбинантные способы и композиции

Антитела можно получить с использованием рекомбинантных методик и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. Для этих способов предлагается одна или более выделенных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело.

В случае нативного антитела или фрагмента нативного антитела требуются две нуклеиновые кислоты, одна для легкой цепи или ее фрагмента и одна для тяжелой цепи или ее фрагмента. Такая(-ие) нуклеиновая(-ые) кислота(-ы) кодирует(-уют) аминокислотную последовательность, содержащую VL и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). Данные нуклеиновые кислоты могут находиться на одном и том же векторе экспрессии или на разных векторах экспрессии.

В одном варианте осуществления предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, используемое в способах, описанных в настоящем документе.

В дополнительном варианте осуществления предложены один или более векторов (например, экспрессирующих векторов), содержащих такую(-ие) нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы).

В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую(-ие) нуклеиновую(-ые) кислоту(-ы).

В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, трансформирована с):

(1) вектор, содержащий нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или

(2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или лимфоидной клеткой (например,

клеткой Y0, NS0, Sp2/0). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и необязательно выделение антитела из клетки-хозяина или культуральной среды клетки-хозяина.

Для рекомбинантной продукции антитела нуклеиновые кислоты, кодирующая антитело, например, как описано выше, являются выделенными и вставлены в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такие нуклеиновые кислоты могут быть легко выделены и секвенированы с использованием обычных способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела) или получены рекомбинантными способами или получены химическим синтезом.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела можно продуцировать в бактериях, в частности, если гликозилирование и Fc-эффекторные функции не нужны. Экспрессию фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, в US 5648237, US 5789199 и US 5840523. См. также Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*. После экспрессии антитело может быть выделено из бактериальной клеточной пасты в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

В дополнение к прокариотам, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, являются эукариотические микроорганизмы, например, мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей с «гуманизированными» путями гликозилирования, что приводит к продукции антитела с картиной гликозилирования, частично или полностью характерной для человека. См. Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; и Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Подходящие для экспрессии гликозилированного антитела клетки-хозяева также происходят от многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные штаммы бакуловирусов, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Кроме того, в качестве хозяев можно использовать культуры клеток растений. См., например, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978 и US 6417429 (описывающую технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

Кроме того, в качестве хозяев можно использовать клетки позвоночных. Например, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные к росту в суспензии. Другими примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); клетки почек новорожденного хомячка (ВНК); клетки сертоли мыши (клетки ТМ4, как описано, например, в Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии buffalo (BRL 3A); клетки легких человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в статье Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе DHFR-клетки CHO (DHFR - дигидрофолатредуктаза) (Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, пригодных для продукции антител, см., например, в e.g., Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

IV. Анализы

Антитела предложенные в настоящем документе, можно идентифицировать, подвергать скринингу, или исследовать их физические/химические свойства и/или биологическую активность с помощью различных анализов, известных в данной области техники.

Анализ связывания и другие анализы

В одном аспекте исследовали антиген-связывающую активность антитела согласно изобретению, например, с помощью таких известных методов, как ELISA (иммуноферментный анализ), вестерн-блоттинг, и т.д.

В другом аспекте конкурентные анализы могут быть использованы для идентификации антитела, которое конкурирует с aCLDN18.2 за связывание с CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления такое конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), который связан с

CLDN18.2. Подробные примеры способов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," в *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

В примерном конкурентном анализе иммобилизованный CLDN18.2 инкубировали в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с CLDN18.2, и второе немеченое антитело, которое тестировали на его способность конкурировать с первым антителом за связывание с CLDN18.2. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный CLDN18.2 инкубировали в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубирования в условиях, благоприятных для связывания первого антитела с CLDN18.2, удаляли избыток несвязанного антитела и измеряли количество метки, связанной с иммобилизованным CLDN18.2. Если количество метки, связанной с иммобилизованным CLDN18.2, существенно снижается в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с CLDN18.2. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Анализ активности

В одном аспекте предложены анализы для идентификации антител к CLDN18.2, обладающих биологической активностью. Биологическая активность может включать, например, эффект антител к CLDN18.2 на ADCC с помощью РВМС на клетки-мишени, экспрессирующие CLDN18.2. Также предложены антитела, обладающие такой биологической активностью *in vivo* и/или *in vitro*.

ПРИМЕРЫ

После первоначального скрининга четыре положительные линии гибридомных клеток иммунизированных мышей были идентифицированы со специфическим связыванием с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, но не с клетками, экспрессирующими CLDN18.1.

Пример 1: клонирование четырех CLDN18.2-специфических моноклональных антител (mAb) из клеток гибридомы мыши.

Этот пример иллюстрирует клонирование генов H и L-цепи (H -тяжелая, L - легкая) антитела из клеток гибридомы мыши с получением последовательностей вариабельной области, специфичных для CLDN18.2, для получения химерных антител.

Следуя обычным процедурам в данной области техники, РНК выделяли и очищали из клеток гибридомы с использованием набора Quick-RNA™ Microprep Kit (ZYMO Research, кат. № R1050). Синтезировали кДНК первой цепи и проводили RACE с использованием набора SMARTer® RACE 5'/3' (Takara Bio USA, Inc. кат. № 634858) вместе с константным праймером IgG1 3' (SEQ ID NO: 35), константным праймером IgG2a 3' (SEQ ID NO: 36) и константным праймером Каппа 3' (SEQ ID NO: 37). Продукты RACE ДНК подвергали экстракции гелем с помощью геля NucleoSpin и набора для очистки PCR (NucleoSpin Gel и PCR Clean-Up kit) (Takara, кат. № 740986.20). Слитую реакционную смесь линейаризованного вектора pRACE и гель-очищенного продукта RACE трансформировали в компетентные клетки Stellar (Clontech, кат. № 636766). Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, кат. № 27104) и подвергали секвенированию по Сэнгеру (GENEWIZ) с использованием праймеров для секвенирования M13. Были получены конечные последовательности генов четырех пар тяжелых и легких цепей (данные не показаны), которые были определены ниже как mAb CLDN18.2 (mAb1, mAb2, mAb3 и mAb4).

Пример 2: конструирование химерных антител для замены константной области мыши на константную область человека

Этот пример иллюстрирует конструирование химерных антител путем замены константных областей 4 молекулярно клонированных mAb мыши на константные области из тяжелой цепи IgG1 человека и легкой цепи каппа.

Плазмиду pFUSE-CHIg-hG1 (InvivoGen, Cat # pfuse-hchg1), которая содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO: 9), и плазмиду pFUSE2-CLIg-hk (InvivoGen, Cat # pfuse2-hclk), которая содержит константную область легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 10), расщепляли с помощью Hind III и либо Nhe I для IgG1, либо BsiW I для каппа (все из NEB lab). Линейаризованные плазмиды очищали путем очистки гелем с использованием геля NucleoSpin и набора для очистки PCR (Takara, кат. № 740986.20). Кодированные последовательности для переменных областей тяжелой и легкой цепей мыши mAb1, mAb2, mAb3 и mAb4 амплифицировали с помощью PCR, используя HiFi HotStart (Кара (Roche), KK2602) из плазмид, полученных в Примере 1, вместе со специфическими праймерами (данные не показаны), и очищали путем очистки гелем с использованием геля NucleoSpin и набора для очистки PCR (Takara, Cat. № 740986.20). Линейаризованный вектор и фрагмент вставки собирали с использованием набора Gibson Assembly® HiFi 1 Step Kit (SGI (VWR), кат. № GA1100-50). Реакционную смесь для сборки трансформировали в компетентные клетки Stellar (Clontech, кат. № 636766). Плазмидную ДНК выделяли из трансформантов с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit

(Qiagen, кат. № 27104) и подвергали секвенированию по Сэнгеру (GENEWIZ). Были сконструированы четыре химерных антитела, каждое из которых включало вариабельную область одного из четырех мышинных mAb, полученных в Примере 1. Новые химерные антитела обозначены как YL-G1-19-01, YL-G1-19-02, YL-G1-19-03 и YL-G1-19-04.

Пример 3: подтверждение специфичности этих четырех химерных моноклональных антител посредством окрашивания поверхности

Этот пример иллюстрирует тест 4 химерных моноклональных антител с их специфичностью связывания CLDN18.2 по сравнению с эталонным mAb (IMAB362, Ganymed).

Клетки 293Т, экспрессирующие CLDN18.2, и клетки 293Т, экспрессирующие CLDN18.1, при плотности 2×10^6 клеток/мл в буфере FACS (50 мкл) смешивали с серией разведений (60,00, 20,00, 6,67, 2,22, 0,74, 0,25, 0,08 мкг/мл в буфере FACS) химерных антител, эталонного антитела или отрицательного контроля IgG (50 мкл) в 96-луночном планшете с V-образным дном и инкубировали в течение 30 минут на льду. После промывки 200 мкл/лунку буфера FACS клетки ресуспендировали в 30 мкл/лунку вторичного антитела Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Human IgG (антитело козы против IgG человека), Fcγ-фрагмента специфичного (Jackson, кат. №109-605-098) и инкубировали в течение 20 минут на льду. После трех промывок 200 мкл/лунку буфера FACS клетки ресуспендировали 150 мкл/лунку буфера FACS и подвергали FACS с использованием проточного цитометра (HTS) BD LSR II. Для анализа данных использовали среднее геометрическое и строили графики с использованием Prism GraphPad. Анализ проточной цитометрии показал, что 4 химерных антитела имеют более высокое специфическое связывание с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, по сравнению с эталонным mAb (см. фиг. 2). Связывание с клетками, экспрессирующими CLDN18.1, не было показано (см. фиг. 3), что свидетельствует о высокой специфичности этих четырех химерных антител.

Пример 4: идентификация функциональной активности этих четырех химерных антител с помощью анализа ADCC.

Этот пример иллюстрирует тест ADCC-опосредованной активности уничтожения этих 4 химерных антител по сравнению с эталонным mAb (IMAB362, Ganymed).

Клетки 293Т, экспрессирующие CLDN18.2, и клетки 293Т, экспрессирующие CLDN18.1, метили CFSE с использованием eBioscience™ CFSE (Thermo, Cat. №65-0850-84). Меченые CFSE клетки с плотностью 4×10^5 клеток/мл в среде для деления клеток Lympholyte® (Cedarlane, кат. № CL5110) (50 мкл) смешивали с серией разведений (20,00, 6,67, 2,22, 0,74, 0,25, 0,08, 0,03 мкг/мл в среде) химерных антител, эталонного антитела или отрицательного контроля IgG (100 мкл) в 96-луночном планшете с V-образным дном и

инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли РВМС с плотностью 5×10^6 клеток/мл (50 мкл) и планшет инкубировали в течение 2 часов при 37 °С в темноте. Клетки дважды промывали PBS и добавляли 100 мкл рабочего раствора фиксируемого красителя для определения жизнеспособности eFluor™ (Fixable Viability Dye eFluor™) eBioscience™ 660 (Thermo, кат. № 65-0864) на лунку. Планшет инкубировали 30 минут на льду в темноте. После промывки PBS клетки ресуспендировали путем добавления 75 мкл/лунку PBS и 25 мкл/лунку 4% параформальдегида и подвергали FACS с использованием проточного цитометра (HTS) BD LSR II. Процент уничтожения (популяция с двойным положительным результатом CFSE/FVD-AF660 по сравнению с популяцией с положительным результатом CFSE) использовался для анализа данных, и графики были сделаны с использованием Prism GraphPad. Активность ADCC методом на основе FACS показала, что 4 химерных антитела могут опосредовать активность ADCC против клеток, экспрессирующих CLDN18.2 (см. фиг. 4).

Пример 5: характеристика химерных антител, сконструированных на основе Fc.

Кроме того, были сконструированы четыре химерных антитела с модифицированным Fc. По сравнению с 1^м поколением исходные химерные антитела YL-G1-19-01, YL-G1-19-02, YL-G1-19-03 и YL-G1-19-04, 2^м поколением химерные антитела YL-G2-A, YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D, со сконструированным Fc (в YL-G2-D первые два N-концевых аминокислотных остатка домена VH отсутствуют по сравнению с YL-G1-19-04), содержат пять замен в Fc-области, а именно L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, согласно нумерации EU. Мутантная константная область (включая CH1, шарнир, CH2 и CH3) тяжелой цепи IgG1 человека представлена в SEQ ID NO: 40.

Этот пример иллюстрирует характеристику этих химерных антител со сконструированным Fc.

5.1: антиген-антителосвязывающее взаимодействие.

Этот пример иллюстрирует характеристику антиген-антителосвязывающего взаимодействия YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D.

Биологическую активность YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D *in vitro* анализировали путем мониторинга связывания с рекомбинантными клетками huCLDN18.2-Fc и CHO, сверхэкспрессирующими huCLDN18.2, с использованием системы KinExA 4000 (KinExA, США).

Для определения аффинности с использованием способа KinExA проводили серийное разведение партнера по связыванию B (известного как титрант) на фоне партнера по связыванию A (известного как постоянный партнер по связыванию, СВР). Это означает, что СВР будет оставаться в постоянной концентрации, в то время как титрант будет

отличаться по концентрации. Как только эти растворы придут в равновесие, прибор KinExA 4000 может непосредственно измерить количество несвязанного или партнера по связыванию в свободной форме СВР, оставшегося в растворах. Используя программное обеспечение Sapidyne, процент СВР в свободной форме может быть нанесен на график относительно общей концентрации титранта для получения кривой связывания и определения аффинности.

Kd сначала определяли с помощью антител и рекомбинантного человеческого CLDN18.2, приобретенного у Sino Biological (P/N: 20047-H02H). Для равновесного эксперимента титрант (huCLDN18.2) серийно разбавляли в пять раз на фоне СВР. Два равновесных эксперимента проводили один с высокой концентрацией СВР при 10 нМ (20 нМ сайтов связывания) с 150 нМ титранта, серийно разведенного в пять раз, и один с низкой концентрацией СВР при 100 пМ (200 пМ сайтов связывания) с 150 нМ титранта, серийно разведенного в пять раз. Данные собирали на KinExA 4000 и анализировали с использованием программного обеспечения для анализа n-кривой Sapidyne Instruments версии 4.4.26. Кривые связывания показаны на фиг. 5.

Инструмент KinExA 4000 также использовали для измерения аффинности связывания антител с поверхностным белком интактных клеток, то есть клеток СНО, сверхэкспрессирующих huCLDN18.2. Концентрацию антител поддерживали постоянной (СВР), а концентрацию целых клеток с поверхностным белком изменяли (титрант). Концентрацию целых клеток с поверхностными белками разбавляли в три раза. Титрованные клетки инкубировали с постоянным партнером по связыванию (СВР). После достижения равновесия образцы центрифугировали, супернатанты извлекали, а свободный СВР обнаруживали с помощью флуоресцентно меченной молекулы против СВР. Кривые связывания показаны на фиг. 6.

Для установления более точной Kd (равновесная константа диссоциации) были подготовлены и проанализированы две кривые равновесия. Одна кривая с низкой концентрацией СВР при 100 пМ (200 пМ сайтов связывания) и 10^6 клеток/мл с трехкратными разведениями и одна кривая с высокой концентрацией СВР при 10 нМ (20 нМ сайтов связывания) и 10^6 клеток/мл с трехкратными разведениями. С помощью KinExA 4000 измеряли количество несвязанного СВР в растворе. Анализ проводили с использованием программного обеспечения для анализа n-кривой Sapidyne Instruments версии 4.4.26. Сводная информация о равновесной константе диссоциации Kd приведена в таблице 1.

Таблица 1 Значения Kd YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D

| ID | Связывание с рекомбинантным huCLDN18.2-Fc (нМ) | Связывание с клетками CHO, сверхэкспрессирующими huCLDN18.2 (пМ) |
|---------|--|--|
| YL-G2-B | 1,7 | 9,4 |
| YL-G2-C | 3,8 | 38,6 |
| YL-G2-D | 6,4 | 13,1 |

5.2: анализ связывания с клетками.

Этот пример иллюстрирует анализ связывания клеток YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D.

Для оценки связывания антител использовали клетки CHO, экспрессирующие huCLDN18.2. Клетки высевали в количестве 5×10^5 клеток на 100 мкл в лунку 96-луночного планшета для каждого образца. Затем к клеткам добавляли 100 мкл каждого серийно разбавленного антитела, каждое разведение начинали с 40 мкг/мл и разбавляли в 5 раз. Таким образом, конечная концентрация каждого антитела начинается с 20 мкг/мл с последующим 5-кратным серийным разведением. Через 1 час клетки дважды промывали и в каждую лунку добавляли 100 мкл GAN-FITC (GAN - коза против человека, FITC - флуоресцеин изотиоцианат) разведение 1:200). Через 30 минут клетки дважды промывали и ресуспендировали в 120 мкл буфера FACS. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Неокрашенные клетки использовали в качестве эталона для настройки общего гейтирования клеток-мишеней и для установления FITC-отрицательных популяций, что позволило нам установить FITC-положительный гейт клеток для каждой клеточной линии. Кроме того, была рассчитана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) всей популяции клеток для вторичной валидации FITC-положительных результатов. Отношение числа гейтированных положительных клеток к общему числу живых клеток принимают как процент положительных клеток. Результаты показаны на фиг. 7.

5.3: анализ комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Этот пример иллюстрирует анализ комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D.

Клетки-мишени (т.е. клетки CHO, экспрессирующие huCLDN18.2) промывали один раз DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко). Затем клетки высевали в планшет с U-образным дном в количестве 2×10^4 клетках, 100 мкл/лунку в RPMI. Антитела последовательно разбавляли в соотношении 1:2 и совместно инкубировали с клетками при 50 мкл/лунку в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем во все лунки, включая

лунки спонтанного высвобождения и максимального высвобождения, добавляли 20% объединенную сыворотку при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C в течение 3,5 часов. За 45 минут до окончания инкубационного периода планшет центрифугировали при 1200 об/мин в течение 5 минут и 20 мкл буфера для лизиса (CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, кат. № C20300 и C20301) добавляли только в контрольную лунку с максимальным высвобождением, содержащую клетки-мишени. Пятьдесят мкл супернатанта переносили в 96-луночный планшет с черными стенками вместе с 50 мкл/лунку реакционного буфера (набор для анализа цитотоксичности CyQUANT™ LDH (CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit), кат. № C20300 и C20301), который добавляли во все лунки, а также в лунки с максимальным высвобождением и со спонтанным высвобождением. Планшет инкубировали в темноте в течение 30 минут. В конце инкубации 50 мкл стоп-раствора (CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, кат. № C20300 и C20301) добавляли во все лунки и аккуратно смешивали путем постукивания. OD (оптическая плотность) измеряли при 490 нм и 680 нм. Активность представляла собой процент цитотоксичности: $\% \text{ цитотоксичности} = (\text{экспериментальное значение} - \text{спонтанное высвобождение клетки-мишени, без объемной коррекции}) / (\text{максимальное высвобождение клетки-мишени} - \text{спонтанное высвобождение клетки-мишени, объемная коррекция}) * 100$. Результаты показаны на фиг. 8.

5.4: анализ интернализации.

Этот пример иллюстрирует анализ интернализации YL-G2-B, YL-G2-C и YL-G2-D.

Клетки CHO, экспрессирующие huCLDN18.2, получали при 5×10^5 /мл в среде DMEM (минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко). Высевали 100 мкл клеток в каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном. Тестируемые антитела и контрольные антитела разбавляли до 40 мкг/мл, затем серийно разбавляли каждое антитело в культуральной среде в соотношении 1:4. Добавляли каждое разбавленное антитело к клеткам по 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 30 минут. Затем добавляли 40 мкг/мл PEP-ZAP (небольшой Fc-связывающий пептид, слитый с клеточно-токсичным пептидом, разработанным AB Studio Inc.; см. WO 2020/018732 A1) в каждую лунку при 50 мкл/лунку для получения конечной концентрации PEP-ZAP при 10 мкг/мл. Планшет инкубировали при 37 °C в течение 72 часов. Наконец, клетки центрифугировали и обирали 100 мкл супернатанта для измерения LDH. Результаты показаны на фиг. 9.

5.5: анализ антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Этот пример иллюстрирует анализ антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

Для оценки функции ADCC антител использовали мишень (клетки CHO, экспрессирующие huCLDN18.2) и эффекторные клетки (клетки NK 8837-F, ATCC PTA-8837). Клетки-мишени высевали в количестве 2×10^4 клеток на 50 мкл в лунку 96-луночного планшета для каждого образца в среде DMEM-F12+10% FBS (фетальная бычья сыворотка). Затем к клеткам добавляли 100 мкл каждого последовательно разведенного антитела 1:10. Через 20 минут на планшет добавляли NK-клетки в количестве 2×10^5 клеток на 50 мкл, что приводило к соотношению целевая:эффекторная 1:10. После этого добавления конечная концентрация каждого антитела начиналась с 50 мкг/мл, а затем 5, 0,5 и 0,05 мкг/мл. Планшет помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C на 24 часа. Затем клетки окрашивали 7AAD, дважды промывали и ресуспендировали в около 200 мкл буфера FACS. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии.

Неокрашенные клетки использовали в качестве эталона для настройки общего гейтирования клеток-мишеней и для создания 7AAD-отрицательных популяций, что позволяло дифференцировать 7AAD (мертвые клетки) и живые клетки.

Клетки CT26, экспрессирующие huCLDN18.2, также могут быть использованы в качестве клеток-мишеней, и ADCC также может быть определена с помощью LDH.

Сравнение активности ADCC между YL-G1-02 и YL-G2-B (имеющими одинаковую аминокислотную последовательность, за исключением замен VLPLL в Fc-области) показано на фиг. 10. Сводная информация по EC50 показана в таблице 2.

Таблица 2. ADCC YL-G1-02 по сравнению с YL-G2-B

| ID | LDH | | FACS | |
|----------|---------------------|----------|-----------|----------|
| | EC50 (нМ) | Макс (%) | EC50 (нМ) | Макс (%) |
| YL-G1-02 | 0,30 | 29,8 | ~0,2244 | 32,0 |
| YL-G2-B | 0,012 | 55,1 | 0,0073 | 44,1 |
| Изотип | NA (неприменимо) | 1,5 | NA | 8,3 |

Пример 6: функциональная характеристика антител.

6.1: Клетки

Клетки CT26 CLDN18.2 (клетки рака толстой кишки мыши, Kyinno biotechnology, кат. № KC-1195), поддерживаемые в среде DMEM (Gibco, кат. № 31053-036), содержащей 10% FBS (ExCell Bio, кат. №FND500), клетки KATOIII CLDN18.2 (клетки рака желудка человека, Kyinno biotechnology, кат. №KC-1453), поддерживаемые в среде RPMI1640 (RPMI - Онкологический институт имени Розуэлла Парка) (Gibco, кат. № 22400-089), содержащей

10% FBS и клетки NCI-N87 CLDN18.2 (клетки рака желудка человека, Kyinno biotechnology, кат. № KC-1222), поддерживаемые в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS, представляют собой все опухолевые клетки, сверхэкспрессирующие CLDN18.2 человека, и их использовали для определения активности CDC и активности ADCC антител субъекта.

6.2: Анализ CDC

Активность CDC антител субъекта оценивали путем измерения изменения уровня LDH, высвобождаемой в культуральную среду после лизиса клеток. Клетки CT26 CLDN18.2 или клетки КАТОШ CLDN18.2 суспендировали в среде RPMI 1640 без фенолового красного (Gibco, кат. № 11835-030), содержащей 1% FBS при плотности $4E+05$ клеток/мл или $6E+05$ или $1E+06$ клеток/мл, соответственно. Рассматриваемые антитела разбавляли средой RPMI 1640 без фенолового красного, содержащей 1% FBS, до 200, 50, 12,5, 3,13, 0,78, 0,195, 0,0488, 0,0122, 0,00305, 0,000763 и 0,000191 нМ. Нормальный человеческий сывороточный комплемент (Quidel, кат. № A113) разбавляли средой RPMI 1640 без фенолового красного, содержащей 1% FBS, при 1:50. В каждую круглодонную лунку 96-луночного микропланшета (Corning, кат. № 3799), добавляли 50 мкл разбавителя антитела, 50 мкл нормального разбавителя комплемента человеческой сыворотки и 50 мкл суспензии опухолевых клеток. Антитело изотипа IgG1 человека включали в качестве отрицательного контроля. Эталонное антитело (IMAB362, Ganymed) включали в качестве положительного контроля. Микропланшет инкубировали в течение 3-4 часов в инкубаторе, установленном при 37 °C и 5% CO₂. После инкубации было обнаружено высвобождение LDH в супернатант клеточной культуры в соответствии с инструкциями, предоставленными с набором для анализа цитотоксичности LDH (Roche, кат. № 11644793001). Вкратце, микропланшет центрифугировали (Eppendorf, модель 5810R) при 1500 об/мин в течение 5 минут и отбирали 70 мкл супернатанта из каждой лунки и переносили в лунку на новый микропланшет. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата для обнаружения LDH и микропланшет инкубировали при комнатной температуре в течение 0,5-2 часов. Оптическую плотность (OD) при 492 нм детектировали с использованием SpectraMax M5e (Molecular Devices LLC) за вычетом оптической плотности при 690 нм ($OD_{492\text{нм}} - OD_{690\text{нм}}$). Активность CDC антител субъекта рассчитывали по проценту специфического лизиса клеток с использованием следующей формулы:

$$\text{Специфический лизис клеток (\%)} = \frac{(OD_{\text{антитело+комплемент+опухолевая клетка}} - OD_{\text{комплемент+опухолевая клетка}}) * 100}{(OD_{\text{опухолевая клетка+Тритон}} - OD_{\text{опухолевая клетка}})}$$

Данные анализировали с помощью четырехпараметрической нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 и рассчитывали и получали значение EC₅₀.

6.3: Анализ ADCC

Активность ADCC антител субъекта оценивали путем измерения изменения уровня LDH, высвобождаемой в культуральную среду после лизиса клеток. Клетки NCI-N87 CLDN18.2 или клетки КАТОШ CLDN18.2 суспендировали в среде RPMI 1640 без фенолового красного с плотностью $6E+05$ клеток/мл. Рассматриваемые антитела разбавляли средой RPMI 1640 без фенолового красного, содержащей 1% FBS, до 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032, 0,0064, $1,28E-03$, $2,56E-04$, $5,12E-05$, $1,02E-05$, $2,05E-06$, $4,10E-07$, $8,19E-08$, $1,64E-08$, $3,28E-09$, $6,55E-10$, $1,31E-10$, $2,62E-11$ и $5,24E-12$ нМ. Свежие клетки PBMC человека (Saily, от добровольца # XC11057W) суспендировали в среде RPMI 1640 без фенолового красного, содержащего 1% FBS, при плотности $1,2E+07$ клеток/мл. В каждую круглодонную лунку планшета добавляли 96-луночный микропланшет, 50 мкл разбавителя антител, 50 мкл суспензии клеток PBMC человека и 50 мкл суспензии опухолевых клеток. Изотипа IgG1 человека включали в качестве отрицательного контроля. Эталонное mAb (IMAB362, Ganymed) включали в качестве положительного контроля. Микропланшет инкубировали в течение 4-6 часов в инкубаторе, установленном на $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 . После инкубации было обнаружено высвобождение LDH в супернатант клеточной культуры в соответствии с инструкциями, предоставленными с набором для анализа цитотоксичности LDH, как описано выше. Активность ADCC антител субъекта рассчитывали по проценту специфического лизиса клеток с использованием формулы ниже:

$$\text{Специфический лизис клеток (\%)} = \left(\text{OD}_{\text{антитело+PBMC+опухолевая клетка}} - \text{OD}_{\text{PBMC+опухолевая клетка}} \right) * 100 / \left(\text{OD}_{\text{опухолевая клетка+Тритон}} - \text{OD}_{\text{опухолевая клетка}} \right).$$

Данные анализировали с помощью четырехпараметрической нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 и рассчитывали и получали значение EC_{50} .

6.4: Эффект CDC на клетки CT26 CLDN18.2 с помощью анализа LDH

Как показано на фиг. 11 и в таблице 3, две партии YL-G2-B продемонстрировали сопоставимый эффект CDC на клетки CT26 CLDN18.2 (фиг. 11, панель А). YL-G1-19-02, YL-G2-B, YL-G1-19-03, YL-G2-C, YL-G1-19-04 и YL-G2-D демонстрировали более сильный эффект CDC на клетки CT26 CLDN18.2, чем положительный контроль (фиг. 11).

Таблица 3: Эффект CDC на клетки CT26 CLDN18.2

| Антитело | Концентрация (мг/мл) | Чистота (%) | CT26 CLDN18.2 | |
|----------|-------------------------|----------------|-----------------------|------------------------------|
| | | | EC_{50} (нМ) | Макс. (% цитотоксичности) |
| | | | | |

| | | | | |
|---------------------------------|-------|--------|--------|-------|
| Положительный контроль, серия А | 20,63 | 96,80% | ~11,54 | 72,52 |
| YL-G1-19-02 | 0,74 | 97,30% | 0,26 | 73,44 |
| YL-G2-B партия 1 | 18,96 | 97,90% | 0,14 | 75,99 |
| YL-G2-B партия 2 | 50 | 98,70% | 0,12 | 74,74 |
| hIgG1_Изотип, серия А | 13,6 | 99,40% | NA | 10,80 |
| Положительный контроль, серия В | 20,63 | 96,80% | ~10,70 | 54,74 |
| YL-G1-19-03 | 10,73 | 96,00% | 0,24 | 62,21 |
| YL-G2-C | 5,55 | 93,22% | 0,10 | 65,24 |
| hIgG1_Изотип, серия В | 13,6 | 99,40% | NA | -0,23 |
| Положительный контроль, серия С | 20,63 | 96,80% | ~11,86 | 51,65 |
| YL-G1-19-04 | 9,03 | 98,00% | 0,19 | 59,21 |
| YL-G2-D | 4,37 | 98,01% | 0,12 | 71,85 |
| hIgG1_Изотип, серия С | 13,6 | 99,40% | NA | -0,38 |

6.5: Эффект CDC на клетки КАТОIII CLDN18.2 с помощью анализа LDH

Как показано на фиг. 12 и в таблице 4, две партии YL-G2-B продемонстрировали сопоставимый эффект CDC на клетки СТ26 CLDN18.2 (фиг. 12, панель А). YL-G1-19-02, YL-G2-B, YL-G1-19-03, YL-G2-C, YL-G1-19-04 и YL-G2-D демонстрировали более сильный эффект CDC на клетки КАТОIII CLDN18.2, чем положительный контроль (фиг. 12).

Таблица 4: Влияние CDC на клетки КАТОIII CLDN18.2

| Антитело | Концентрация (мг/мл) | Чистота (%) | КАТОIII CLDN18.2 | |
|---------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|---------------------------|
| | | | EC ₅₀ (нМ) | Макс. (% цитотоксичности) |
| Положительный контроль, серия А | 20,63 | 96,80% | ~38,08 | 29,71 |
| YL-G1-19-02 | 0,74 | 97,30% | 1,95 | 35,43 |
| YL-G2-B партия 1 | 18,96 | 97,90% | 1,24 | 39,65 |

| | | | | |
|---------------------------------|-------|--------|--------|-------|
| YL-G2-B партия 2 | 50 | 98,70% | 1,33 | 39,42 |
| hIgG1_Изотип, серия А | 13,6 | 99,40% | NA | -0,85 |
| Положительный контроль, серия В | 20,63 | 96,80% | ~22,73 | 45,96 |
| YL-G1-19-03 | 10,73 | 96,00% | ~4,98 | 67,00 |
| YL-G2-C | 5,55 | 93,22% | ~6,04 | 74,56 |
| hIgG1_Изотип, серия В | 13,6 | 99,40% | NA | -2,46 |
| Положительный контроль, серия С | 20,63 | 96,80% | ~27,48 | 34,89 |
| YL-G1-19-04 | 9,03 | 98,00% | 4,76 | 48,32 |
| YL-G2-D | 4,37 | 98,01% | 2,40 | 49,19 |
| hIgG1_Изотип, серия С | 13,6 | 99,40% | NA | -1,53 |

6.6: Эффект ADCC на клетки КАТОIII CLDN18.2 с помощью анализа LDH

Как показано на фиг. 13 и в таблице 5, две партии YL-G2-B продемонстрировали сопоставимый эффект ADCC на клетки КАТОIII CLDN18.2 (фиг. 12, панель А). YL-G2-B ($EC_{50} = 0,028$ нМ или 0,018 нМ для разных партий), YL-G2-C ($EC_{50} = 0,019$ нМ) и YL-G2-D ($EC_{50} = 0,021$ нМ) демонстрировали более сильный эффект ADCC (более низкий EC_{50}) и YL-G1-19-02 ($EC_{50} = 0,16$ нМ), YL-G1-19-03 ($EC_{50} = 0,21$ нМ) и YL-G1-19-04 ($EC_{50} = 0,14$ нМ) демонстрировали сопоставимый эффект ADCC на клетки КАТОIII CLDN18.2 по сравнению с положительным контролем ($EC_{50} = 0,12$ нМ, 0,22 нМ или 0,27 нМ для трех циклов) (фиг. 13).

Таблица 5: Влияние ADCC на клетки КАТОIII CLDN18.2

| Антитело | Концентрация (мг/мл) | Чистота (%) | КАТОIII CLDN18.2 | |
|---------------------------------|----------------------|-------------|------------------|---------------------------|
| | | | EC_{50} (нМ) | Макс. (% цитотоксичности) |
| Положительный контроль, серия А | 20,63 | 96,80% | 0,12 | 27,89 |
| YL-G1-19-02 | 0,74 | 97,30% | 0,16 | 19,90 |
| YL-G2-B партия 1 | 18,96 | 97,90% | 0,028 | 19,90 |

| | | | | |
|---------------------------------|-------|--------|-------|-------|
| YL-G2-B партия 2 | 50 | 98,70% | 0,018 | 15,78 |
| hIgG1_Изотип, серия А | 13,6 | 99,40% | NA | 0,3 |
| Положительный контроль, серия В | 20,63 | 96,80% | 0,22 | 24,46 |
| YL-G1-19-03 | 10,73 | 96,00% | 0,21 | 16,72 |
| YL-G2-C | 5,55 | 93,22% | 0,019 | 17,57 |
| hIgG1_Изотип, серия В | 13,6 | 99,40% | NA | -5,51 |
| Положительный контроль, серия С | 20,63 | 96,80% | 0,27 | 24,54 |
| YL-G1-19-04 | 9,03 | 98,00% | 0,14 | 15,44 |
| YL-G2-D | 4,37 | 98,01% | 0,021 | 18,42 |
| hIgG1_Изотип, серия С | 13,6 | 99,40% | NA | -7,64 |

6.7: Влияние ADCC на клетки NCI-N87 CLDN18.2 с помощью анализа LDH

Как показано на фиг. 14 и в таблице 6, две партии YL-G2-B продемонстрировали сопоставимый эффект ADCC на клетки NCI-N87 CLDN18.2 (фиг. 14, панель А). YL-G2-B ($EC_{50} = 0,0067$ нМ или $0,012$ нМ для разных партий), YL-G2-C ($EC_{50} = 0,0078$ нМ) и YL-G2-D ($EC_{50} = 0,0089$ нМ) демонстрировали более сильный эффект ADCC (более низкий EC_{50}) и YL-G1-19-02 ($EC_{50} = 0,072$ нМ), YL-G1-19-03 ($EC_{50} = 0,13$ нМ) и YL-G1-19-04 ($EC_{50} = 0,067$ нМ) демонстрировали сопоставимый эффект ADCC на клетки КАТОIII CLDN18.2 по сравнению с положительным контролем ($EC_{50} = 0,057$ нМ, $0,082$ нМ или $0,10$ нМ для трех циклов) (фиг. 14).

Таблица 6: Эффект ADCC на клетки NCI-N87 CLDN18.2

| Антитело | Концентрация (мг/мл) | Чистота (%) | NCI-N87 CLDN18.2 | |
|---------------------------------|----------------------|-------------|------------------|---------------------------|
| | | | EC_{50} (нМ) | Макс. (% цитотоксичности) |
| Положительный контроль, серия А | 20,63 | 96,80% | 0,057 | 26,05 |
| YL-G1-19-02 | 0,74 | 97,30% | 0,072 | 16,80 |
| YL-G2-B партия 1 | 18,96 | 97,90% | 0,0067 | 19,04 |
| YL-G2-B партия 2 | 50 | 98,70% | 0,012 | 21,05 |
| hIgG1_Изотип, серия А | 13,6 | 99,40% | NA | -6,73 |

| | | | | |
|---------------------------------|-------|--------|--------|--------|
| Положительный контроль, серия В | 20,63 | 96,80% | 0,082 | 22,06 |
| YL-G1-19-03 | 10,73 | 96,00% | 0,13 | 15,21 |
| YL-G2-C | 5,55 | 93,22% | 0,0078 | 14,93 |
| hIgG1_Изотип, серия В | 13,6 | 99,40% | NA | -11,72 |
| Положительный контроль, серия С | 20,63 | 96,80% | 0,10 | 21,11 |
| YL-G1-19-04 | 9,03 | 98,00% | 0,067 | 12,59 |
| YL-G2-D | 4,37 | 98,01% | 0,0089 | 18,60 |
| hIgG1_Изотип, серия С | 13,6 | 99,40% | NA | -9,22 |

6.8: SPR (Поверхностный плазмонный резонанс)

Аффинность связывания рассматриваемых антител определяли с помощью SPR в соответствии с USP 43 IMMUNOLOGICAL TEST METHODS -- SURFACE PLASMON RESONANCE <1105> and CP, 2020 edition, Part IV, General Rules, 3429 IMMUNOCHEMISTRY, NON-LABELING IMMUNOCHEMICAL METHODS (IV) SURFACE PLASMON RESONANCE, с использованием набора для захвата антител человека, тип 2 (Human Antibody Capture Kit, type 2) (Cytiva, кат. № 29234600). Вкратце, антитело к IgG (Fc) человека разбавляли иммобилизационным буфером до 25 мкг/мл и вводили на чип Sensor CM5 серии S (Cytiva, кат. № BR100530) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 6 минут для получения около 7000-14000 единиц ответа (RU) связанного вторичного антитела. Затем рассматриваемое антитело разбавляли подвижным буфером до 5 мкг/мл и вводили со скоростью потока 10 мкл/минуту с получением около 200 RU связанного первичного антитела. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения (0,195-50 нМ) His-меченного человеческого клаудина-18.2 вводили со скоростью потока 30 мкл/минуту и отслеживали связывание в течение 120 секунд для ассоциации и 300 секунд для диссоциации на Biacore 8K (Cytiva). Скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) рассчитывали с использованием простой модели взаимно-однозначного связывания путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывают как отношение k_d/k_a . Результаты приведены в таблице 7 ниже.

Таблица 7

| Рассматриваемое антитело | Уровень захвата (RU) | k_a (1/Mc) | k_d (1/c) | K_D (M) | $R_{\text{макс}}$ (RU) | Chi^2 (RU ²) |
|--------------------------|----------------------|--------------|-------------|-----------|------------------------|-----------------------------------|
| YL-G1-19-02 | 162,4 | 6,73E+05 | 1,41E-03 | 2,09E-09 | 181,1 | 7,15 |
| YL-G1-19-03 | 163,1 | 4,75E+05 | 5,67E-04 | 1,19E-09 | 167,9 | 1,26 |
| YL-G1-19-04 | 168,6 | 6,28E+05 | 7,80E-04 | 1,24E-09 | 175,1 | 3,30 |
| YL-G2-B | 168,7 | 6,86E+05 | 1,40E-03 | 2,05E-09 | 187,5 | 9,14 |
| YL-G2-C | 160,5 | 5,32E+05 | 5,91E-04 | 1,11E-09 | 177,7 | 3,85 |
| YL-G2-D | 169,4 | 7,07E+05 | 7,22E-04 | 1,02E-09 | 187,2 | 3,67 |

Таблица последовательностей

| SEQ ID NO | Описание | Последовательность |
|-----------|----------------|---|
| 1 | YL-G1-19-01 VH | QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLI EWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGK ATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYG NSFGYWGQGLTVTSA |
| 2 | YL-G1-19-01 VL | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQ KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFT GSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPFTF GSGTKLEIK |
| 3 | YL-G1-19-02 VH | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKM NWVKQSNQKSLWIGNIDPYYGGTTYNQKFKGK ATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGK GNTMDYWGQGTSTVTVSS |
| 4 | YL-G1-19-02 VL | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQ KNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFT GSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCQNAIYPLTF GTGKLELK |
| 5 | YL-G1-19-03 VH | QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMS WVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGR VAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRG NALDNWGQGTSTVTVSS |
| 6 | YL-G1-19-03 VL | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQ KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFT |

| | | | |
|----|-----------------------|----|--|
| | | | GSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNNYFYPLTF GAGTRLELK |
| 7 | YL-G1-19-04 VH | | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKM NWVKQSNGESLEWIGNIDPYYGDTTYTQKFKGK ATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRG NTMDYWGQGTSTVTVSS |
| 8 | YL-G1-19-04 VL | | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWYQQRPGQPPELLIYWASTRESGVPVRF GSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYFCQNAYFYPLTF GTGTKLELR |
| 9 | IgG1 человека | CH | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 10 | Каппа человека | CL | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC |
| 11 | YL-G1-19-01 HVR-H1 | | GYAFTNYL |
| 12 | YL-G1-19-01 HVR-H2 | | INPGSGGT |
| 13 | YL-G1-19-01 HVR-H3 | | ARVYYGNSFGY |
| 14 | YL-G1-19-01 HVR-L1 | | QSLNSGNQKNY |
| 15 | YL-G1-19-01 HVR-L2 | | WAS |

| | | |
|----|----------------------------|--------------|
| 16 | YL-G1-19-01 HVR-L3 | QNEYFYPT |
| 17 | YL-G1-19-02 HVR-H1 IMGT | GYSFTGYK |
| 18 | YL-G1-19-02 HVR-H2 IMGT | IDPYYGGT |
| 19 | YL-G1-19-02 HVR-H3 IMGT | ARYGKGNTMDY |
| 20 | YL-G1-19-02 HVR-L1 IMGT | QSLNLSGNQKNY |
| 21 | YL-G1-19-02 HVR-L2 IMGT | WAS |
| 22 | YL-G1-19-02 HVR-L3 IMGT | QNAYIYPLT |
| 23 | YL-G1-19-03 HVR-H1 | GFPFTTDG |
| 24 | YL-G1-19-03 HVR-H2 | INTYSGVP |
| 25 | YL-G1-19-03 HVR-H3 | ARFRRGNALDN |
| 26 | YL-G1-19-03 HVR-L1 | QSLNLSGNQKNY |
| 27 | YL-G1-19-03 HVR-L2 | WAS |
| 28 | YL-G1-19-03 HVR-L3 | QNNYFYPLT |
| 29 | YL-G1-19-04 HVR-H1 | GYSFTGYK |
| 30 | YL-G1-19-04 HVR-H2 | IDPYYGDT |
| 31 | YL-G1-19-04 HVR-H3 | ARYNRGNTMDY |
| 32 | YL-G1-19-04 HVR-L1 | QSLNLSGNQKNY |

| | | |
|----|--|---|
| 33 | YL-G1-19-04 HVR-L2 | WAS |
| 34 | YL-G1-19-04 HVR-L3 | QNAYFYPLT |
| 35 | 3'-константный праймер IgG1 | GATTACGCCAAGCTTTCATTTACCAGGAGAGTG GGAGAGGCTC |
| 36 | 3'-константный праймер IgG2a | GATTACGCCAAGCTTTCATTTACCCGGAGTCCGG GAGAAGCTC |
| 37 | 3'-константный праймер каппа | GATTACGCCAAGCTTTC AACACTCATTCCTGTTG AAGCTCTTG |
| 38 | huCLDN18.2 (261 aa (аминокислота)) | MAVTACQGLGFVVS LIGIAGIIAATCMDQWSTQDL YNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTL LGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIR IGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFA NMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFG AALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETN YKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKK IYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV |
| 39 | huCLDN18.1 (261 aa) | MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQD LYDNPVTSVFQYEG LWRSCVRQSSGFTECRPYFTI LGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIR IGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFA NMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFG AALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETN YKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNTKNKK IYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV |
| 40 | Мутантный IgG1 СН человека | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELVGGPSVFLPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPPEEQYNSTLRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY |

| | | |
|----|---|--|
| | | KTTPLVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 41 | YL-G1-19-02 HVR-H1 по Кабату | GYKMN |
| 42 | YL-G1-19-02 HVR-H2 по Кабату | NIDPYYGGTTYNQKFKG |
| 43 | YL-G1-19-02 HVR-H3 по Кабату | YGKGNTMDY |
| 44 | YL-G1-19-02 HVR-L1 по Кабату | KSSQSLNLSGNQKNYLT |
| 45 | YL-G1-19-02 HVR-L2 по Кабату | WASTRES |
| 46 | YL-G1-19-02 HVR-L3 по Кабату | QNAYIYPLT |
| 47 | YL-G1-19-02 HVR-H1 по Чотиа | GYSFTGY |
| 48 | YL-G1-19-02 HVR-H2 по Чотиа | DPYYGG |
| 49 | YL-G1-19-02 HVR-H3 по Чотиа | YGKGNTMDY |
| 50 | YL-G1-19-02 HVR-L1 по Чотиа | KSSQSLNLSGNQKNYLT |

| | | |
|----|---|---------------|
| 51 | YL-G1-19-02 HVR-L2 по Чотиа | WASTRES |
| 52 | YL-G1-19-02 HVR-L3 по Чотиа | QNAYIYPLT |
| 53 | YL-G1-19-02 HVR-H1 по Контакту | TGYKMN |
| 54 | YL-G1-19-02 HVR-H2 по Контакту | WIGNIDPYYGGTT |
| 55 | YL-G1-19-02 HVR-H3 по Контакту | ARYGKGNTMD |
| 56 | YL-G1-19-02 HVR-L1 по Контакту | LNSGNQKNYLTWY |
| 57 | YL-G1-19-02 HVR-L2 по Контакту | LLIYWASTR |
| 58 | YL-G1-19-02 HVR-L3 по Контакту | QNAYIYPL |

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, специфически связывающееся с CLDN18.2 (клаудин 18.2), содержащее:

HVR-H1 (гипервариабельная область 1 тяжелой цепи), HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH (вариабельная область тяжелой цепи), представленной в SEQ ID NO: 3, и HVR-L1 (гипервариабельная область 1 легкой цепи), HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL (вариабельная область легкой цепи), представленной в SEQ ID NO: 4.

2. Моноклональное антитело по п. 1, содержащее:

(1) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 17, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 18, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 19, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 20, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 21, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 22;

(2) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 40, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 41, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 42, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 43, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 44, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 45;

(3) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 46, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 47, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 48, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 49, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 50, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 51; или

(4) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 52, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 53, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 54, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 55, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 56, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 57.

3. Моноклональное антитело по п. 1, содержащее VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4.

4. Моноклональное антитело по любому из пп. 1-3, представляющее собой мышиное антитело, химерное антитело или гуманизованное антитело.

5. Моноклональное антитело по любому из пп. 1-3, представляющее собой полноразмерное антитело.

6. Моноклональное антитело по п. 5, содержащее константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 9, и/или константную область легкой цепи каппа человека, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 10.

7. Моноклональное антитело по любому из пп. 1-3, представляющее собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, необязательно выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента scFv и диатела.

8. Моноклональное антитело по любому из пп. 1-7, являющееся выделенным, голым и/или конъюгированным.

9. Моноклональное антитело со сконструированным Fc, специфически связывающееся с CLDN18.2, содержащее:

HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, содержащиеся в VH, представленной в SEQ ID NO: 3, и HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, содержащиеся в VL, представленной в SEQ ID NO: 4, и содержащее одну или более областей Fc.

10. Моноклональное антитело по п. 9, содержащее:

(1) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 17, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 18, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 19, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 20, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 21, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 22;

(2) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 41, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 42, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 43, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 44, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 45, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 46;

(3) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 47, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 48, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 49, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 50, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 51, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 52; или

(4) HVR-H1, представленную в SEQ ID NO: 53, HVR-H2, представленную в SEQ ID NO: 54, HVR-H3, представленную в SEQ ID NO: 55, HVR-L1, представленную в SEQ ID NO: 56, HVR-L2, представленную в SEQ ID NO: 57, и HVR-L3, представленную в SEQ ID NO: 58.

11. Моноклональное антитело по п. 9, содержащее:

VH, представленную в SEQ ID NO: 3, и VL, представленную в SEQ ID NO: 4, необязательно, где первые два N-концевых аминокислотных остатка VH отсутствуют.

12. Моноклональное антитело по любому из пп. 9-11, представляющее собой химерное антитело или гуманизированное антитело.

13. Моноклональное антитело по любому из пп. 9-12, где одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более мутаций, которые модифицируют,

например, увеличивают или уменьшают связывание с Fc-рецептором и/или эффекторную функцию, например, ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность).

14. Моноклональное антитело по п. 13, где одна или более мутаций в Fc-области представляют собой одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

15. Моноклональное антитело по пп. 9-11, содержащее константную область тяжелой цепи IgG человека, в частности IgG1, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 40,

и/или константную область легкой цепи каппа человека, необязательно, представленную в SEQ ID NO: 10.

16. Моноклональное антитело по любому из пп. 9-15, являющееся выделенным, голым и/или конъюгированным.

17. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело по любому из пп. 1-16.

18. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 17.

19. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 17 или вектор по п. 18.

20. Способ получения моноклонального антитела по любому из пп. 1-16 путем культивирования клетки-хозяина по п. 19 с получением антитела и необязательного выделения антитела из клетки-хозяина или культуры клеток.

21. Композиция, содержащая моноклональное антитело по любому из пп. 1-16.

по Кабату

Вариабельная область тяжелой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|--|-----|
| YL-G1-19-01 | QVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPQSGGGTNY | 60 |
| YL-G1-19-02 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLWIGNIDPYYGGTTY | 60 |
| YL-G1-19-03 | QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPTTDDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY | 60 |
| YL-G1-19-04 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLWIGNIDPYYGGTTY | 60 |
| | * * * * * | |
| YL-G1-19-01 | NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGLTVTUSA | 118 |
| YL-G1-19-02 | NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARVYGGKNTMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-03 | ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRGNALDNWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-04 | IQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNTMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| | *** | |

Вариабельная область легкой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|--|-----|
| YL-G1-19-01 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-02 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-03 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-04 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| | * * * * * | |
| YL-G1-19-01 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFTFGSGTKLEIK | 113 |
| YL-G1-19-02 | ESGVPVRFRTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNAVYFPLTFTFGTGKLELK | 113 |
| YL-G1-19-03 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCQNNYFYPLTFTFGAGTRLELK | 113 |
| YL-G1-19-04 | ESGVPVRFRTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFCQNAVYFPLTFTFGTGKLELR | 113 |
| | * * * * * | |

Фиг. 1А

по IMGT
(база данных ImMunoGeneTics)

Вариабельная область тяжелой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|--|-----|
| YL-G1-19-01 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNY | 60 |
| YL-G1-19-02 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLGWIGNIDPYYGGTTY | 60 |
| YL-G1-19-03 | QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPTTIDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY | 60 |
| YL-G1-19-04 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNQKSLGWIGNIDPYYGDTTY | 60 |
| | *** * * ** ** * ** ***** ** ** ** * ** ** ** * | |
| YL-G1-19-01 | NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSTFGYWGQGLTVTVSA | 118 |
| YL-G1-19-02 | NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARYGKGNITMDYWGQGSTVTSS | 118 |
| YL-G1-19-03 | ADDFKGRVAFSLETSSASTAYLQIKNLKNETATYFCARFRRGNALDNWGQGSTVTSS | 118 |
| YL-G1-19-04 | TQKFKGKATFTVDTSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNITMDYWGQGSTVTSS | 118 |
| | *** ***** ** * ** ** * * * ** ** ** * * | |

Вариабельная область легкой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|--|-----|
| YL-G1-19-01 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-02 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-03 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-04 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| | * * | |
| YL-G1-19-01 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCONEYFYPFTFGSGTKLEIK | 113 |
| YL-G1-19-02 | ESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCONAYTYPLTFTGTGKLELK | 113 |
| YL-G1-19-03 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCONNYFYPLTFTGAGTRLELK | 113 |
| YL-G1-19-04 | ESGVPVRFTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCONAYFYPLTFTGTGKLELR | 113 |
| | * * * * * * ** | |

Фиг. 1В

по Чотиа

Вариабельная область тяжелой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|---|-----|
| YL-G1-19-01 | QVQLQQSGAELVLRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNY | 60 |
| YL-G1-19-02 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNKGSLEWIGNIDPYYGGTTY | 60 |
| YL-G1-19-03 | QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPFTTDGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY | 60 |
| YL-G1-19-04 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNGESLEWIGNIDPYYGDTTY | 60 |
| | ** * * ** ** * ** ***** ** ** ** * ** ** ** * | |
| YL-G1-19-01 | NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVYYGNSFGYWGQGLTVTSA | 118 |
| YL-G1-19-02 | NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYGKGNITMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-03 | ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNEDTATYFCARFRRGNALDNWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-04 | TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARYNRGNITMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| | *** ***** ** * ** ** * * * ** ** ** * * | |

Вариабельная область легкой цепи (мышь)

| | | |
|-------------|--|-----|
| YL-G1-19-01 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-02 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-03 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-04 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLLSNGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| | * * | |
| YL-G1-19-01 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNEYFYPTFTFGSGTKLEIK | 113 |
| YL-G1-19-02 | ESGVPVRFRTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNAVYIYPLTFTGTGKLELK | 113 |
| YL-G1-19-03 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNNYFYPLTFTGAGTRLELK | 113 |
| YL-G1-19-04 | ESGVPVRFRTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYFCQNAVYFYPLTFTGTGKLELR | 113 |
| | * * * * * * * * | |

Фиг. 1С

Вариабельная область тяжелой цепи (мышь)

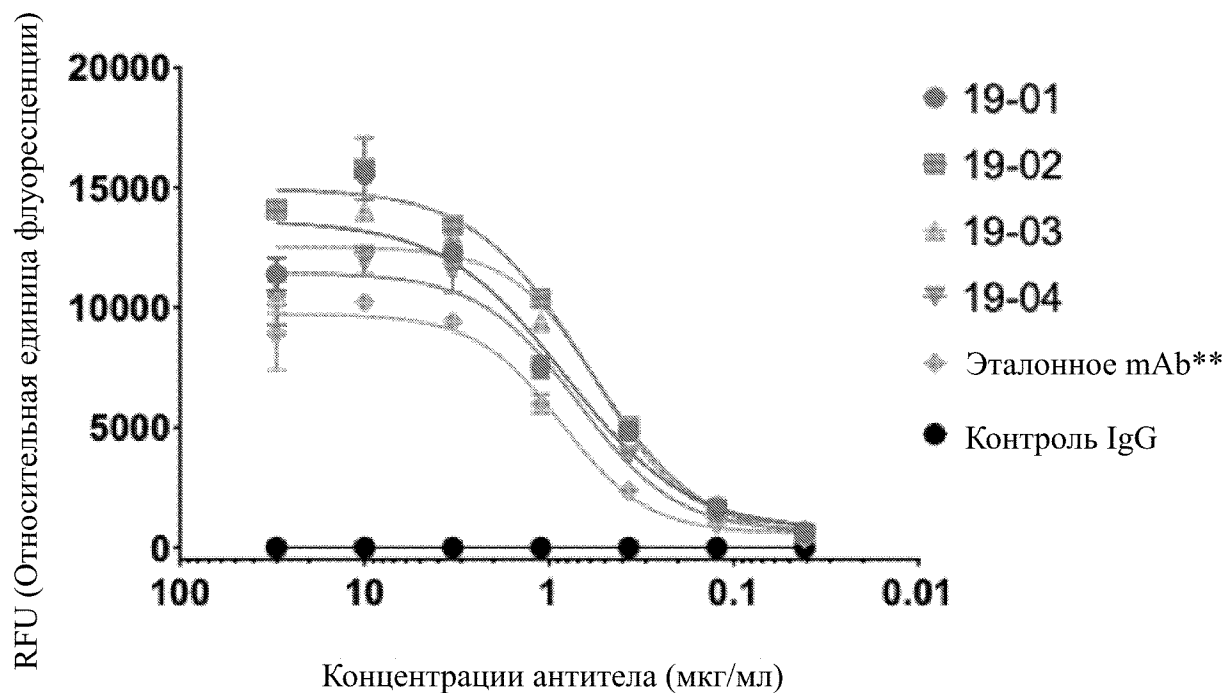
| | | | |
|-------------|---------------------------------|----------------------------------|-----|
| YL-G1-19-01 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAF | TNYLIEWVKQRPQGLEWIGVINPGSGGTNY | 60 |
| YL-G1-19-02 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSF | TGYKMNWVKQSNQKSLWIGNIDPYYGGTTY | 60 |
| YL-G1-19-03 | QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGFPE | TTDGMSSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTY | 60 |
| YL-G1-19-04 | EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSF | TGYKMNWVKQSNQKSLWIGNIDPYYGDTTY | 60 |
| | ** * * ** ** * | ** ***** ** ** ** * ** ** ** * | |
| YL-G1-19-01 | NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDS | SAVYFCARVYYGNSEFYWGQGLTVTVSA | 118 |
| YL-G1-19-02 | NQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDS | SAVYYCARYGKGNMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-03 | ADDFKGRVAFSLETSASTAYLQIKNLKNE | TATYFCARFRGNALDNWGQGSVTVSS | 118 |
| YL-G1-19-04 | TQKFKGKATFTVDTSSSTAYMQLKSLTSEDS | SAVYFCARYNRGNMDYWGQGSVTVSS | 118 |
| | *** ***** ** * ** ** * * * * | *** ***** * * | |

Вариабельная область легкой цепи (мышь)

| | | | |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|-----|
| YL-G1-19-01 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSL | LNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-02 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSL | LNSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-03 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSL | LNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| YL-G1-19-04 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSL | LNSGNQKNYLTWYQQRPGQPPKLLIYWASTR | 60 |
| | | * * | |
| YL-G1-19-01 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC | QNEYFYPTFGSGTKLEIK | 113 |
| YL-G1-19-02 | ESGVPVRFRTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYC | QNAVYIYPLTFGTGKLELK | 113 |
| YL-G1-19-03 | ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYC | QNNYFYPLTFGAGTRLELK | 113 |
| YL-G1-19-04 | ESGVPVRFRTGSGSGADFTLTISVQAEDLAVYFC | QNAVYFYPLTFGTGKLELR | 113 |
| | * * | * * * * * * * * | |

Фиг. 1D

Кривая доза-ответ антитела к клеткам, экспрессирующим CLDN18.2*

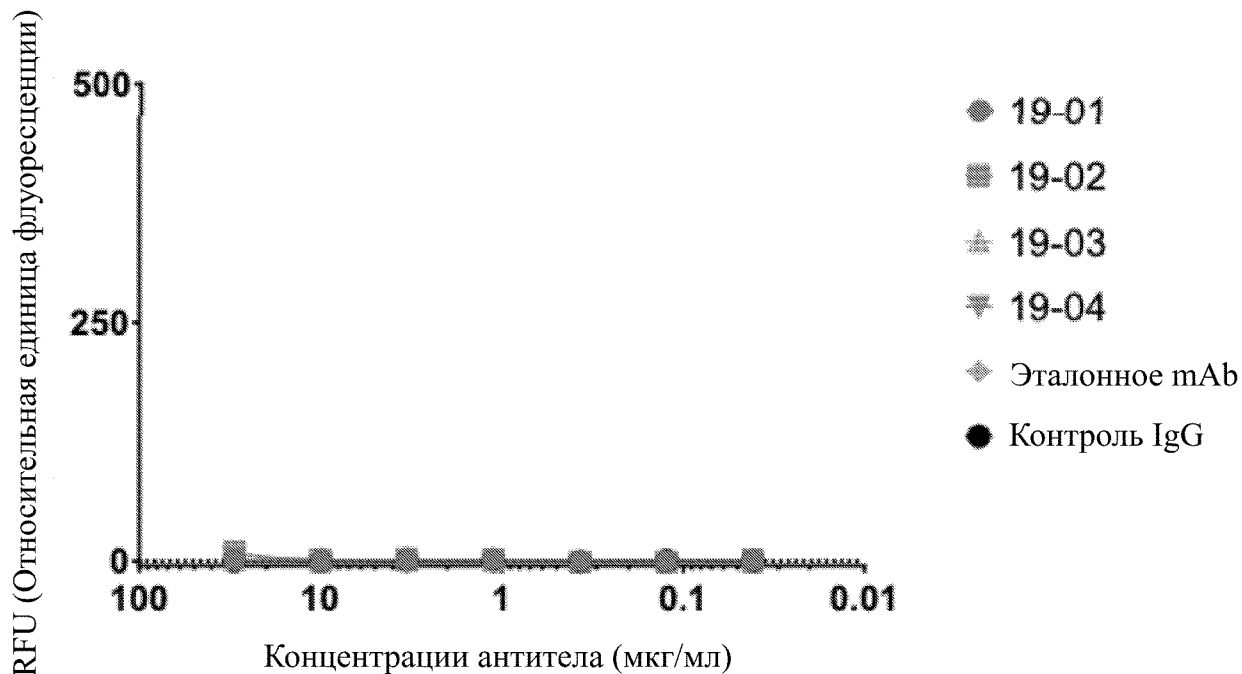


* клаудин 18.2

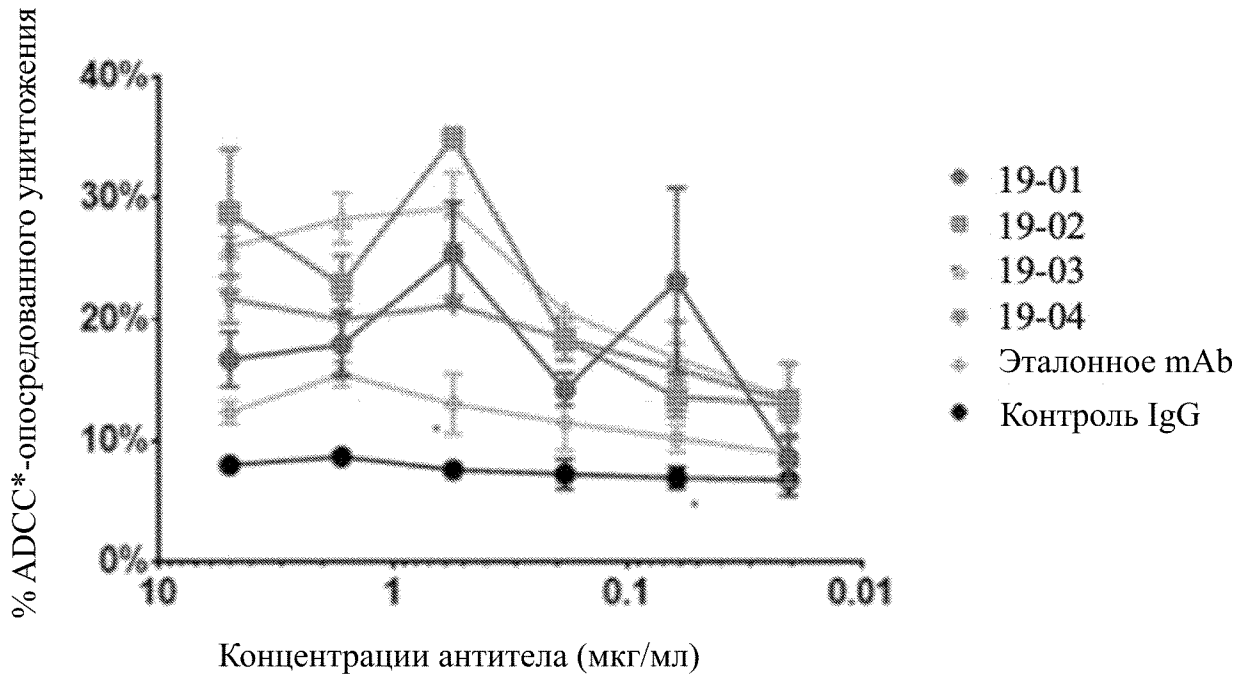
** моноклональное антитело

Фиг. 2

Кривая доза-ответ антитела к клеткам, экспрессирующим CLDN18.1



Фиг. 3



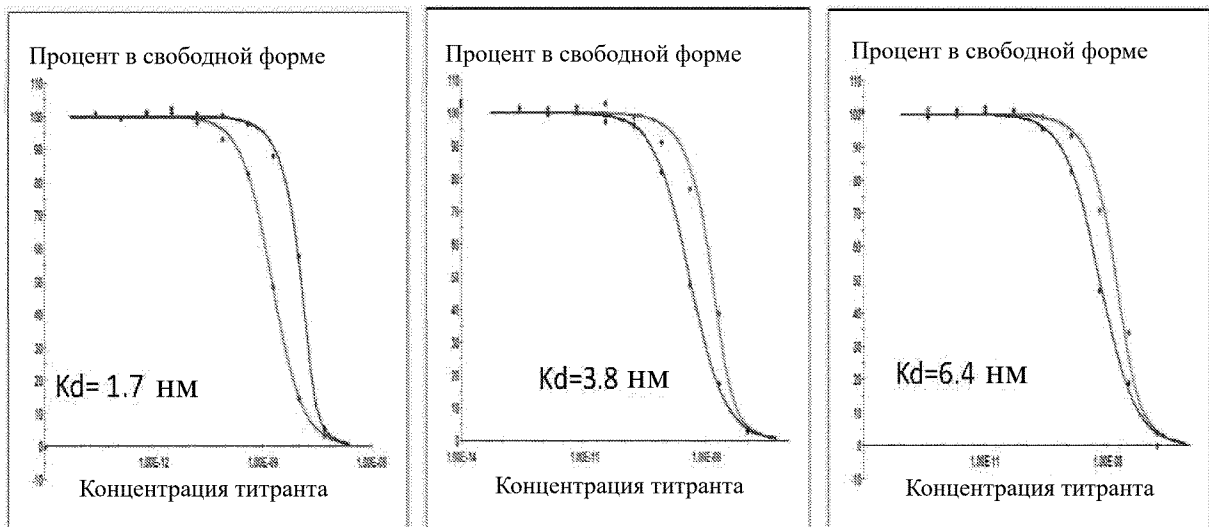
* антителозависимая клеточная цитотоксичность

Фиг. 4

YL-G2-B

YL-G2-C

YL-G2-D

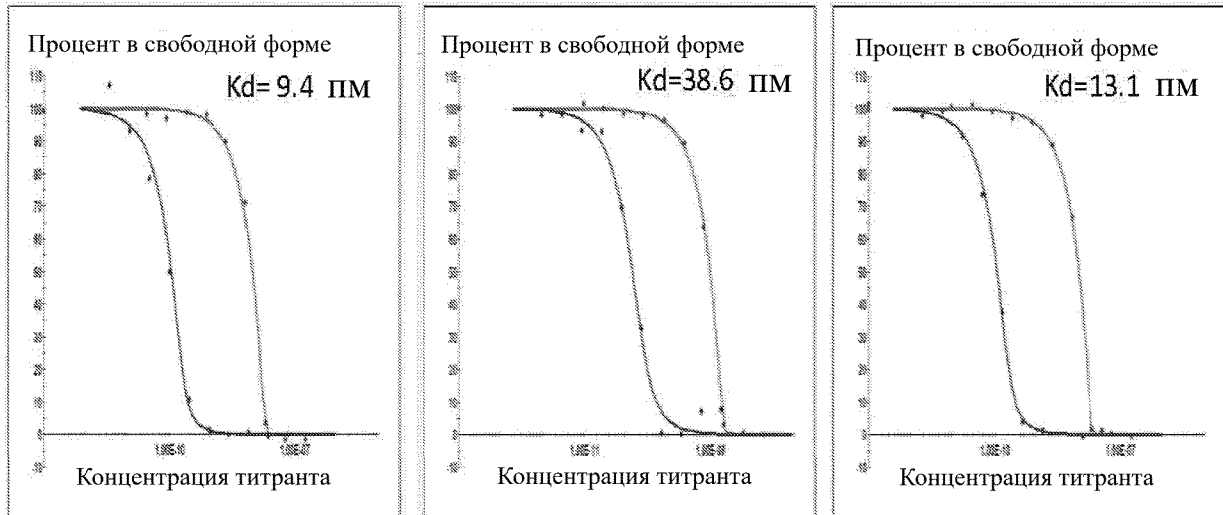


Фиг. 5

YL-G2-B

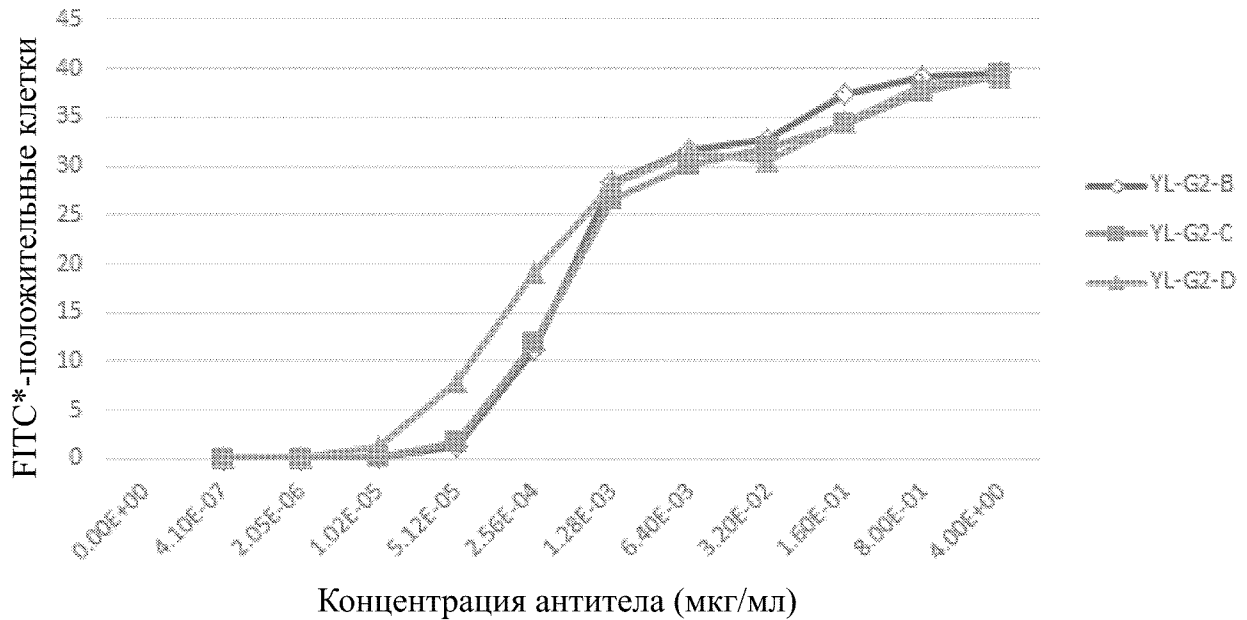
YL-G2-C

YL-G2-D



Фиг. 6

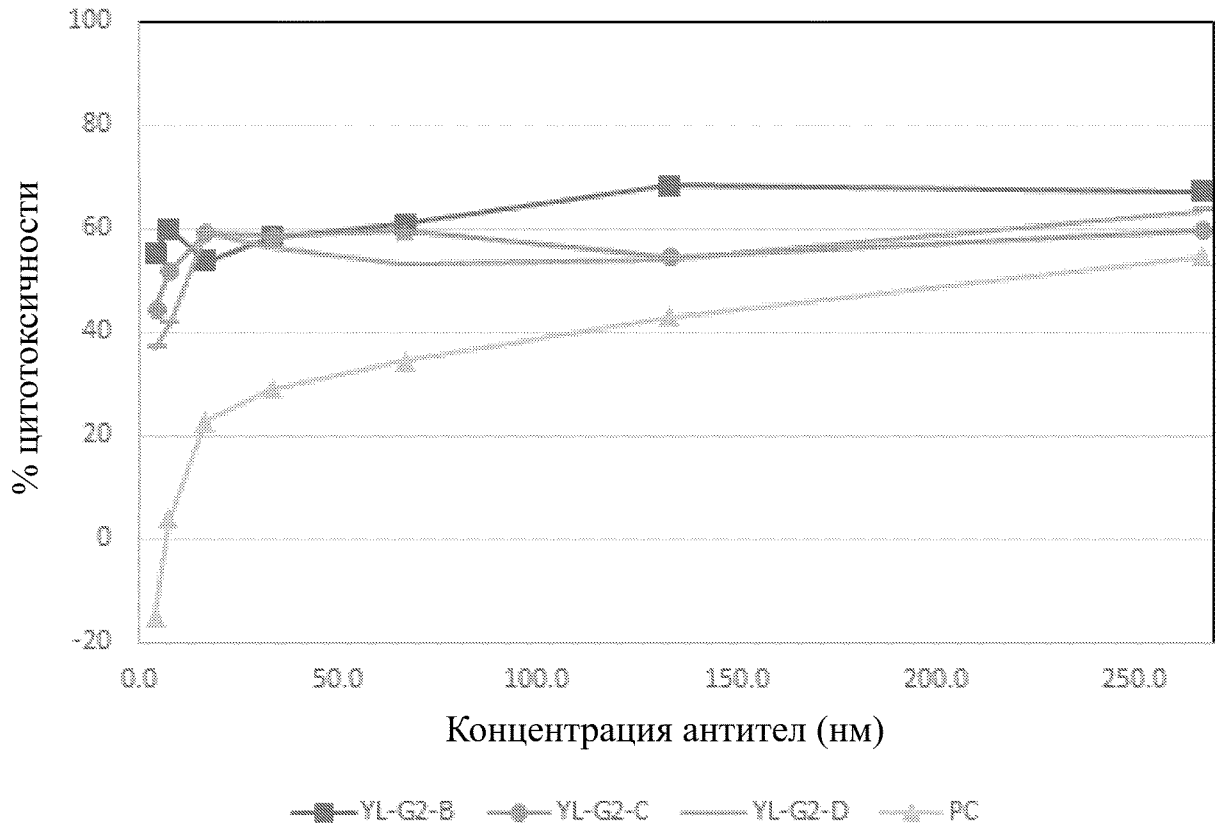
Связывание клеток



* флуоресцеин изотиоцианат

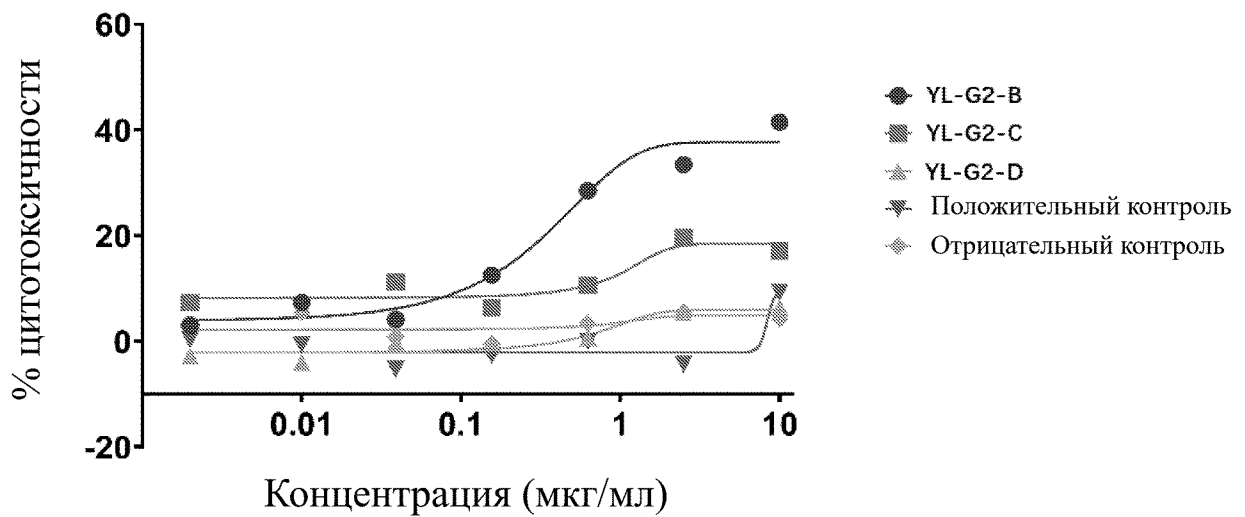
Фиг. 7

Комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC)

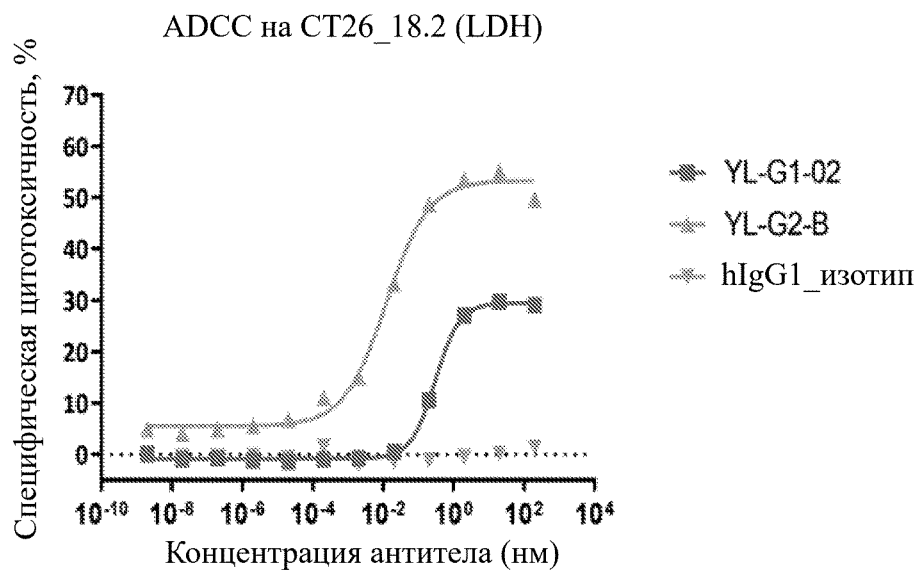
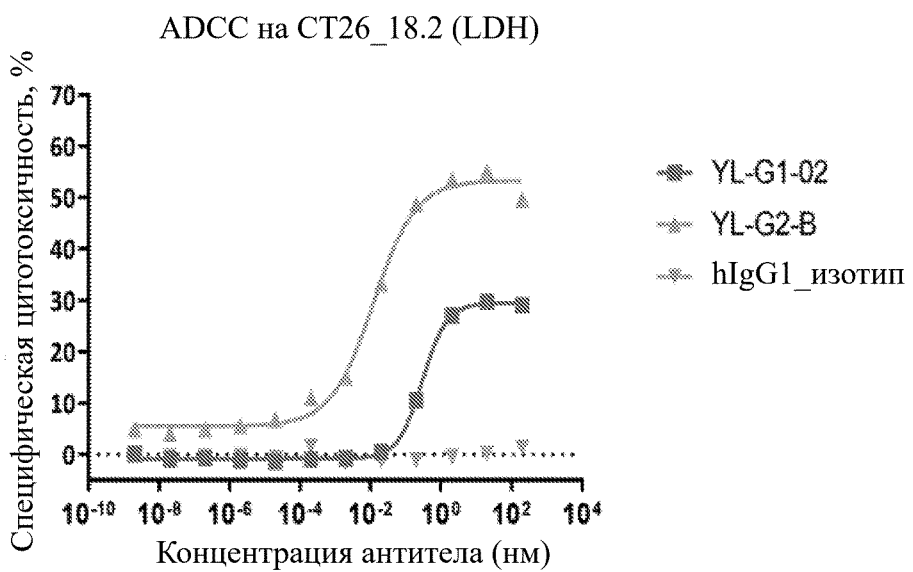


Фиг. 8

Цитотоксичность, опосредованная интернализированным Per-Zap

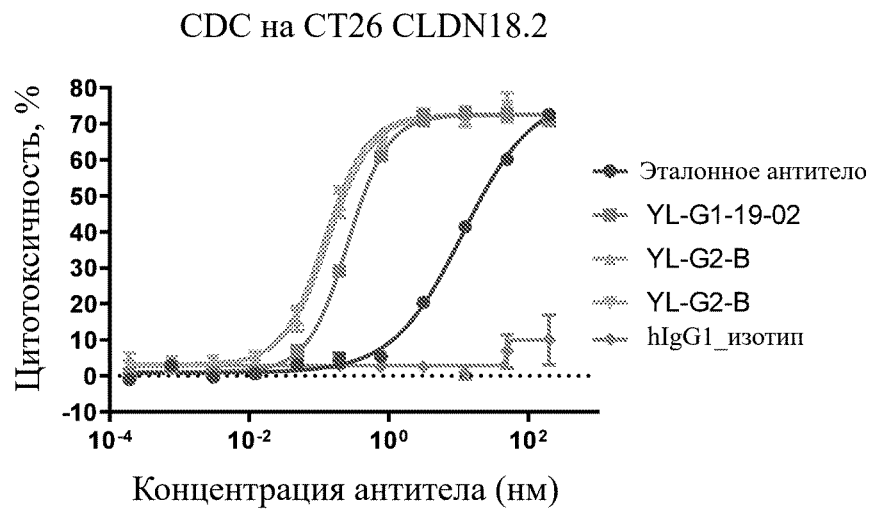


Фиг. 9

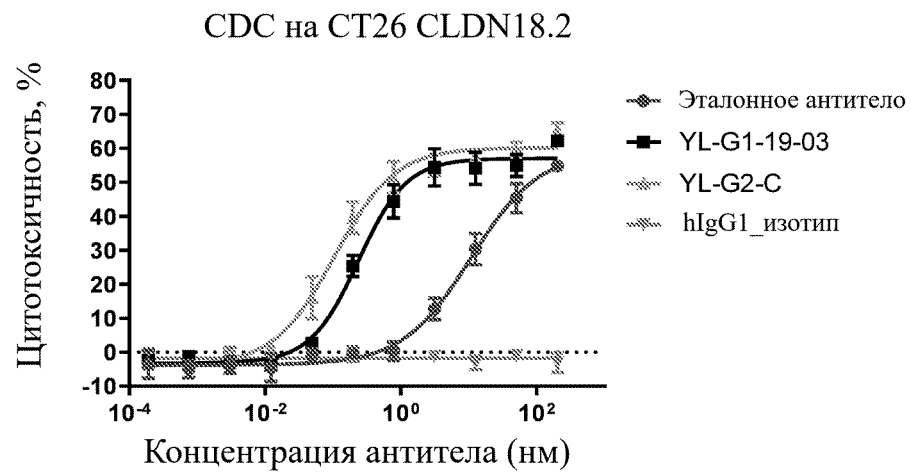


Фиг. 10

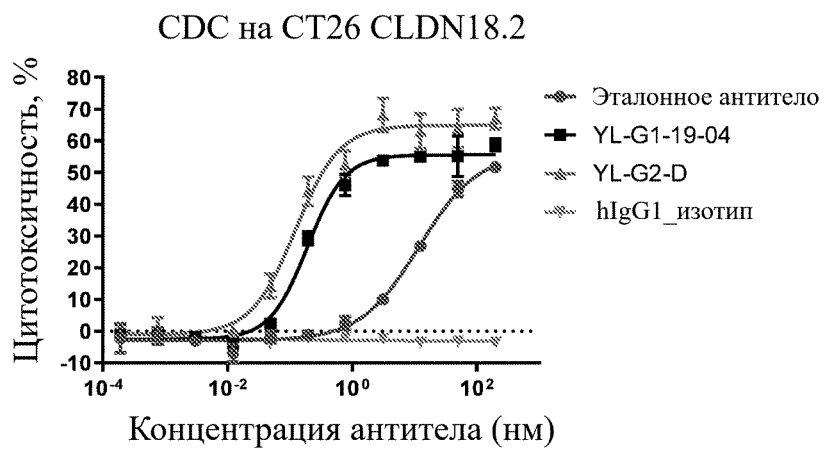
A.



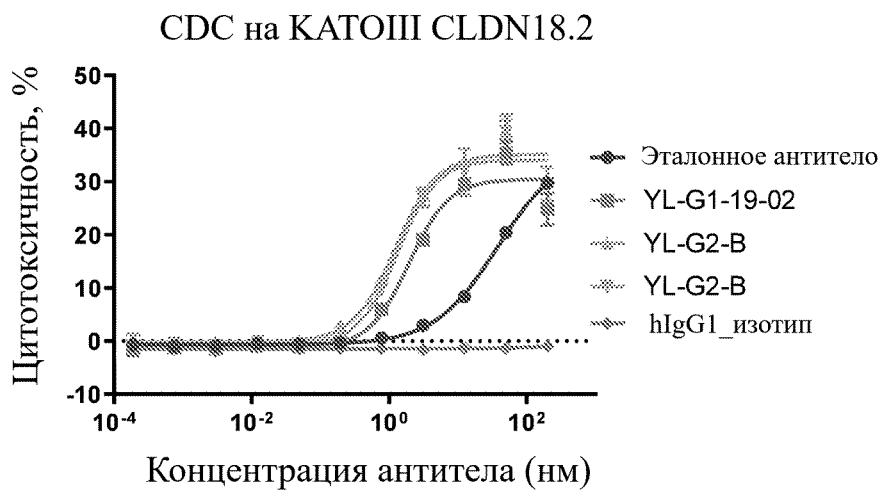
B.



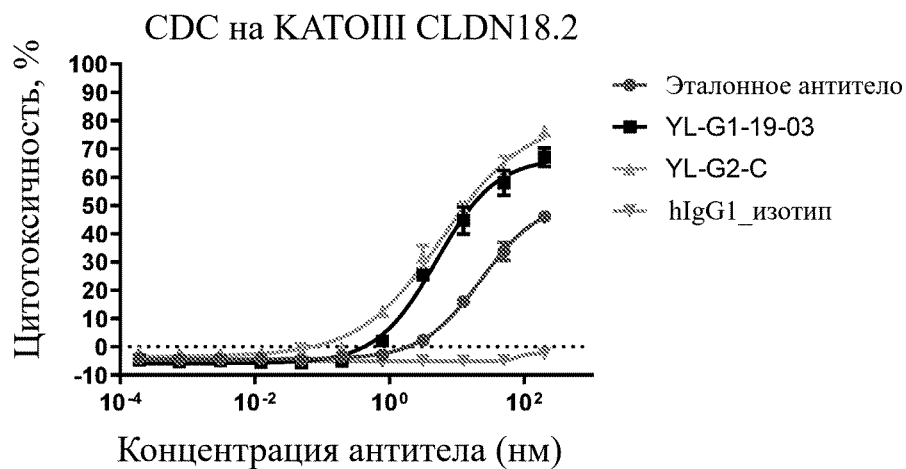
C.



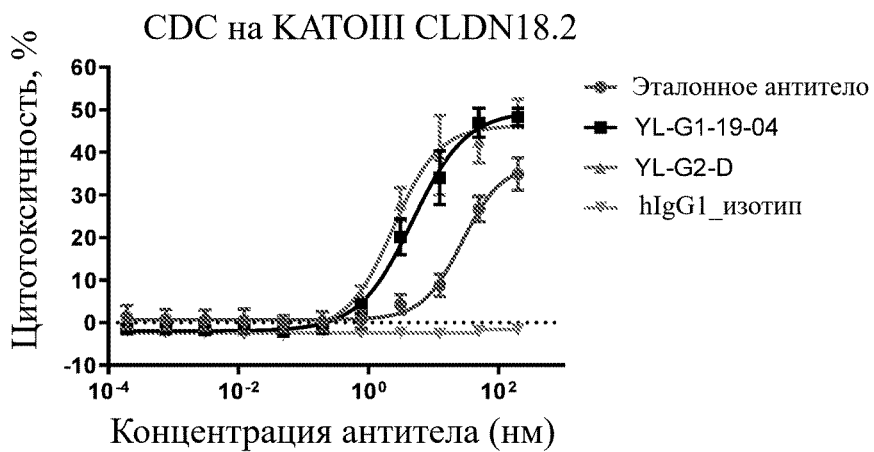
A.



B.

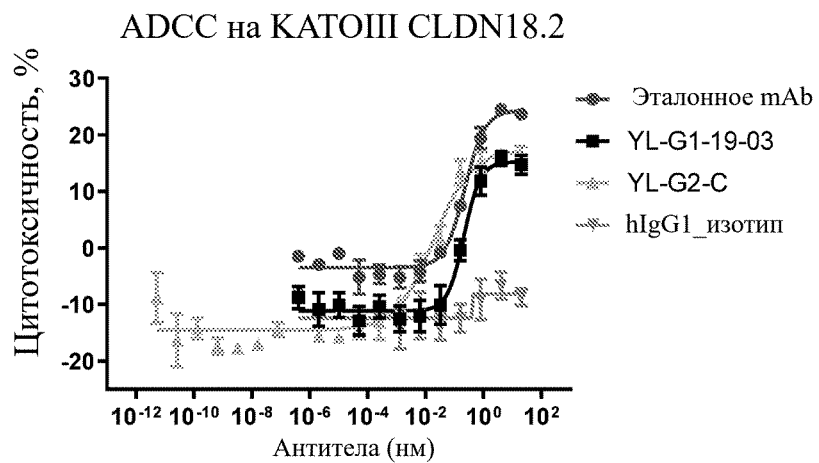


C.

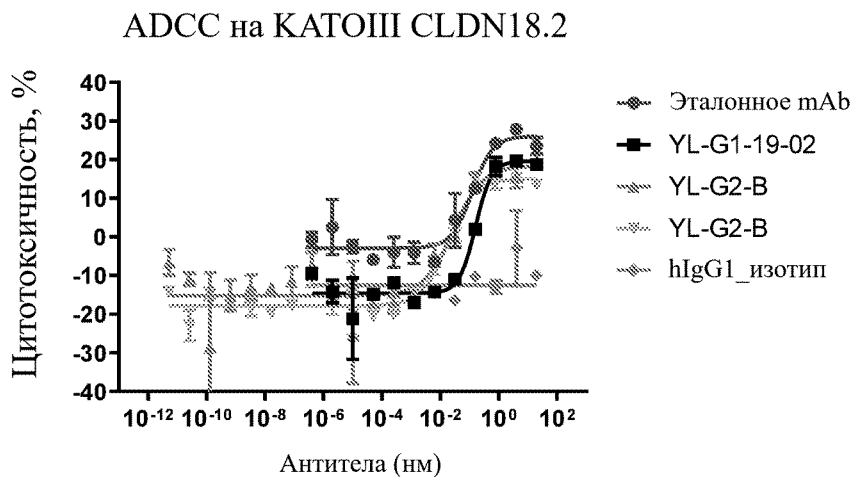


Фиг. 12

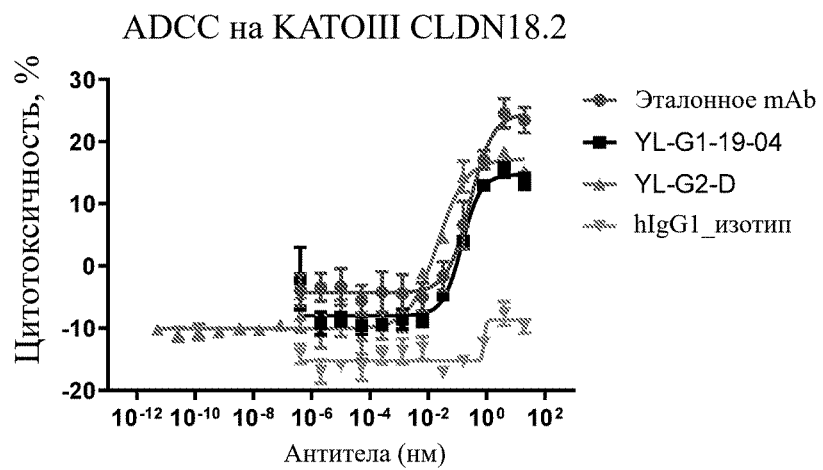
В.



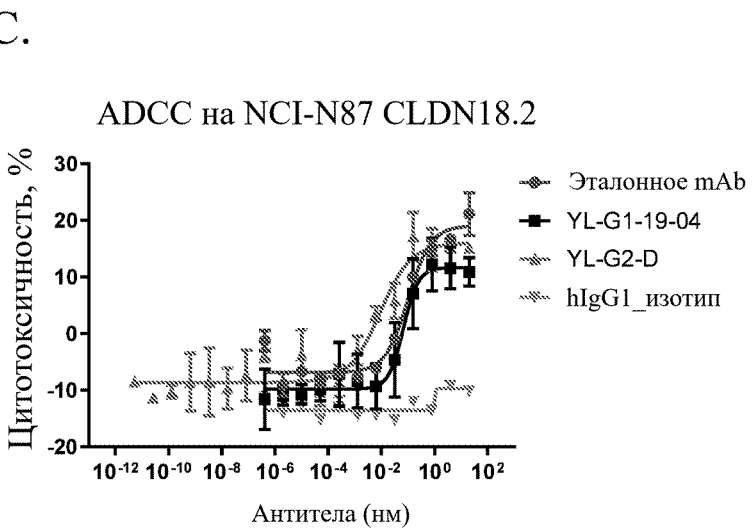
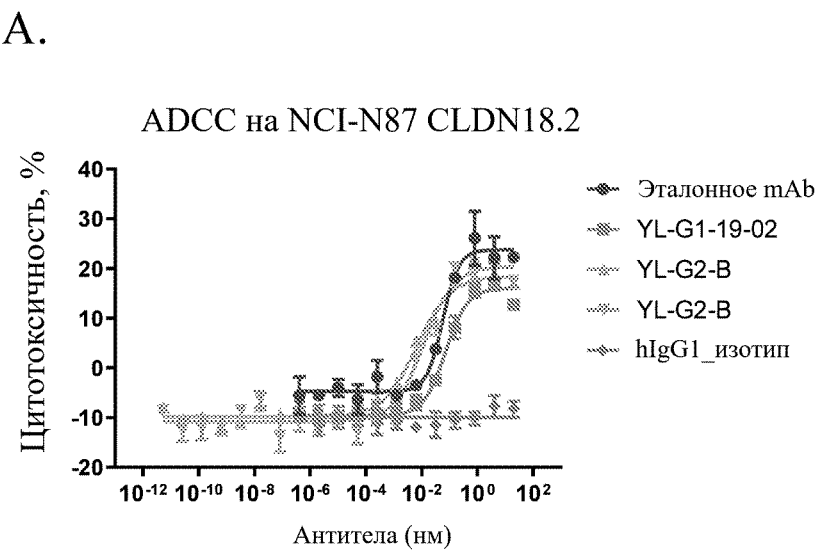
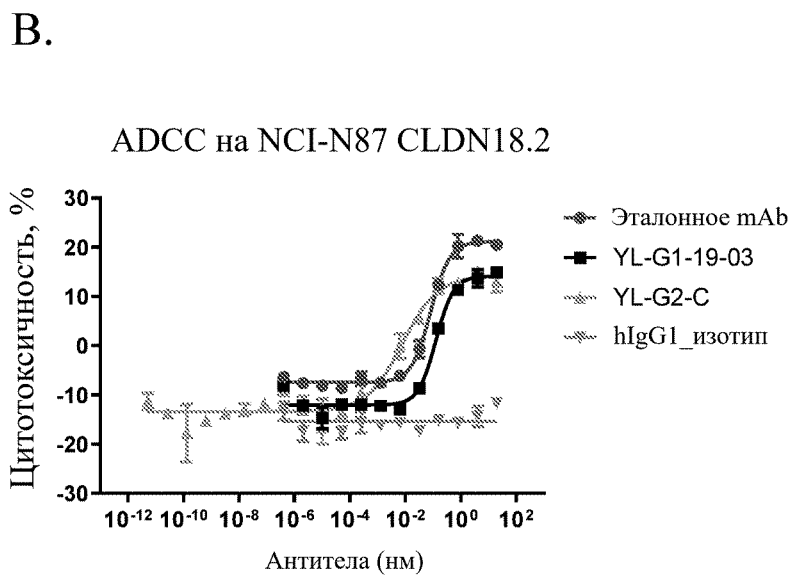
А.



С.



Фиг. 13



Фиг. 14