

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490335 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.04(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.08.04(54) АНТИТЕЛО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА CLDN18.2, БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ
АНТИТЕЛО И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110909032.3

(32) 2021.08.09

(33) CN

(86) PCT/CN2022/110314

(87) WO 2023/016348 2023.02.16

(71) Заявитель:
ХАРБОР БИОМЕД (ШАНХАЙ) КО.,
ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:

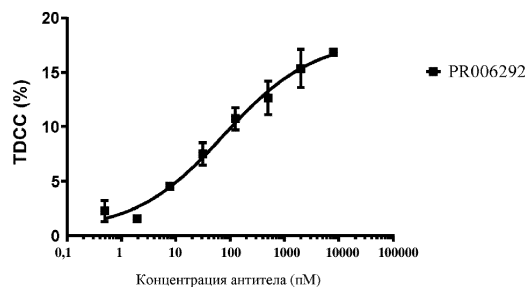
Чжэн Мин-Цзинь, Ван Юнцян, Чжан
Юнь, Чжао Чучу, Ян Юньсин, Чэнь
Фэй, Цинь Бэйбэй, У Юэтао, Дин И
(CN)

(74) Представитель:

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

(57) В настоящем изобретении раскрыты антитела, нацеливающиеся на CLDN18.2, биспецифические антитела и их применение. Антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, представляет собой однодоменное антитело в виде тяжелой цепи, которое характеризуется высокой аффинностью в отношении опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2, и может индуцировать высокую эндоцитарную активность. Биспецифическое антитело может нацеливаться на CLDN18.2 и CD3 и сохраняет эффект связывания Fc с FcRn; при этом предпочтительной является мутантная Fc, поскольку таким образом обеспечивается ослабление связывания с FcγR и следовательно активации неспецифических Т-клеток, вызываемой перекрестным связыванием FcγR. Активность CD3-конца оптимизирована таким образом, чтобы можно было снизить высвобождение общих цитокинов при CRS, таких как IL6 и TNFα.

HEK293/супоCLDN18.2



202490335 A1

202490335 A1

АНТИТЕЛО, НАЦЕЛИВАЮЩЕЕСЯ НА CLDN18.2, БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области биомедицины и в частности к антителу, биспецифическому антителу, нацеливаемому на CLDN18.2, и их применению.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

На сегодняшний день рак является одним из наиболее смертоносных заболеваний у людей. В соответствии с отчетом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2018 год, ежегодно регистрируется примерно 18,07 миллиона новых случаев рака. Ежегодно от рака умирают около 9,55 миллиона человек. По оценкам ВОЗ, рак желудка занимает пятое место среди наиболее часто диагностируемых случаев рака в мире. Рак желудка занимает третье (у мужчин) и четвертое (у женщин) место среди причин смертности от рака. Ежегодно в мире регистрируется один миллион новых случаев рака желудка. Примерно 35% пациентов, у которых впервые диагностирован рак желудка в США, являются пациентами с метастатическим раком желудка. Пятилетний коэффициент выживаемости для тех, у кого диагностирован рак желудка на поздней стадии, составляет 5%, а медианное значение выживаемости составляет приблизительно 6 месяцев. Медикаментозное лечение первой линии для лечения пациентов с метастатическим/рецидивирующим раком желудка подразделяется на два случая: (1) для пациентов, положительных по HER2-neu, применяется трастузумаб в комбинации с химиотерапевтическими лекарственными средствами; (2) для пациентов, отрицательных по HER2-neu, лечение ограничивается химиотерапевтическими лекарственными средствами; однако результат лечения является неудовлетворительным (*Front Pharmacol.*, 13 сентября 2018 года; 9: 404).

Вариант сплайсинга 1 (CLD18A1, а именно CLDN18.1, под номером доступа в Genbank NP_057453, NM016369) и вариант сплайсинга 2 (CLD18A2, а именно CLDN18.2, под номером доступа в Genbank NM_001002026, NP_001002026) молекулы CLDN18 (клаудин 18) представляют собой интегральные трансмембранные белки, имеющие молекулярную массу примерно 27,9/27,72 кДа. Клаудины представляют собой интегральные мембранные белки, расположенные в плотном контакте эпителия и эндотелия. Двумя другими основными белками семейства плотных контактов являются окклюдин и адгезивная молекула контактов (JAM). Клаудины являются важными компонентами плотных контактов и играют важную роль в поддержании полярности эпителиальных клеток, контроле парацеллюлярной диффузии и регуляции роста и дифференцировки клеток. Предполагается, что клаудины не могут находиться рядом с антителами в эпителии нормального строения, но становятся экспонированными в опухолевых клетках. Молекула

клаудина четыре раза пересекает клеточную мембрану, при этом как N-, так и C-концы находятся в цитоплазме. Белок CLDN18.2 человека (клаудин 18.2) представляет собой трансмембранный белок, при полной длине содержащий 261 аминокислоту, из которых 1–23 образуют сигнальный пептид; он содержит две внеклеточные области, следующие за сигнальным пептидом: внеклеточную петлю 1 (ECL1) из приблизительно 55 аминокислот и ECL2 из приблизительно 23 аминокислот. CLDN18.1 (клаудин 18.1) и CLDN18.2 различаются по первой 21 аминокислоте от N-конца, включая первый ТМ и петлю 1 (т. е. ECL1), но имеют идентичные первичные белковые последовательности на C-конце. Области ECL1 в составе CLDN18.2 человека и CLDN18.1 человека очень похожи, а области ECL2 в составе CLDN18.2 человека и CLDN18.1 человека являются идентичными. Таким образом, разработка антител к белкам-мишеням, представляющим собой CLDN18.2 человека, требует поиска антител, нацеленных на область ECL1 или пространственную структуру белка CLDN18.2 человека. Это делает работу в данном аспекте затруднительной. CLDN18.1 избирательно экспрессируется в эпителии нормальных легких и желудка (*Mol Cell Biol.* 2001 Nov; 21(21): 7380-90). Экспрессия CLDN18.2 в нормальных тканях в значительной степени ограничена дифференцированными клетками эпителия желудка и отсутствует в области стволовых клеток желудка. Однако он на высоком уровне экспрессируется при нескольких типах рака, включая опухоли желудка, пищевода, поджелудочной железы и легких, а также в линиях раковых клеток человека. Молекулярная масса белка варьирует при некоторых видах рака и в прилегающих нормальных тканях. Белки с высокой молекулярной массой, наблюдаемые в здоровых тканях, можно преобразовывать в белки с такой же молекулярной массой, как наблюдается в случае рака, путем обработки лизата ткани дегликозилирующим соединением, представляющим собой PNGазу F. Это позволяет предположить, что клаудин является менее N-гликозилированным в случае рака, чем его аналог в нормальных тканях. Это структурное различие, вероятно, обуславливает появление измененных эпитопов. Классический мотив N-гликозилирования находится в аминокислоте в положении 116 в пределах петли домена D3 молекулы (CN103509110B).

В настоящее время исследования моноклональных антител к CLDN18.2 ограничиваются клиническими исследованиями фазы II и фазы III антитела клаудиксимаба (IMAB362) (см. WO 2014/146672). IMAB362 способен индуцировать эффекты в виде ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность), а также опосредовать уничтожение опухолей. IMAB362 продемонстрировало обнадеживающий эффект в клинических исследованиях фазы I и II в отношении лечения распространенного рака желудочно-кишечного тракта (*Eur*

J Cancer; сентябрь 2018 года; 100: 17-26). Однако IMAB362 представляет собой химерное антитело человека или мыши, и таким образом сопряжено с риском иммуногенности, а его аффинность является невысокой. Вследствие неудовлетворенной медицинской потребности в лечении большого числа злокачественных новообразований существует потребность в других антителах к CLDN18.2 с более подходящими фармацевтическими характеристиками. Таким образом, в данной области техники существует нехватка эффективных антител, нацеливающихся на белок CLDN18.2 человека, особенно полностью человеческих моноклональных антител, а также моноклональных антител с лучшей клеточно-связывающей активностью.

В настоящее время биспецифическое антитело к CLDN18.2×CD3, находящееся на стадии клинической разработки, включает AMG910 компании Amgen. AMG910 может индуцировать эффект в виде TDCC (Т-клеточно-зависимой клеточной цитотоксичности), опосредуя уничтожение опухоли. Однако антитела из предшествующего уровня техники могут характеризоваться проблемами, связанными с короткими периодами полужизни, слабыми лекарственными действиями, обуславливанием синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и т. д. Таким образом, существует острая необходимость в разработке более безопасных и более эффективных биспецифических антител, которые нацелены как на CLDN18.2, так и на CD3 человека и могут связываться с CLDN18.2 и CD3 яванского макака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для решения технических задач предшествующего уровня техники, связанных с отсутствием безопасных и эффективных моноклональных антител, нацеливающихся на CLDN18.2 человека, и биспецифических антител, которые нацеливаются как на CLDN18.2 человека, так и на CD3 человека и могут связываться с CLDN18.2 и CD3 яванского макака, настоящее изобретение предусматривает моноклональное антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, биспецифическое антитело, нацеливающееся на CLDN18.2 и CD3, и их применение.

Для решения вышеуказанных технических задач первый аспект настоящего изобретения предусматривает антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 16–18, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42–46 и SEQ ID NO: 48–54, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 77–82.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 77 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 80 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 80 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 81 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 82 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 78 соответственно.

Вышеуказанные комбинации аминокислотных последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3 подробно описаны в таблице а ниже.

Таблица а. Комбинация HCDR антитела, нацеливающегося на CLDN18.2

№	HCDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	№ антитела	SEQ ID NO:	Соответствующая последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующая последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
1	PR004227	16	GFTFSSY	42	NNDGSS	77	APPYGNYERDY
2	PR004533	16	GFTFSSY	43	NSDGSR	78	GEDHDILTGYPI
3	PR004536	16	GFTFSSY	44	NSDGST	79	DFPVLGGSHFDFQH
4	PR004540	17	GFTFSIY	45	SSDGNV	80	GEDHDMLTGYPV
5	PR004949	18	GFTFSAY	43	NSDGSR	80	GEDHDMLTGYPV
6	PR004950	18	GFTFSAY	43	NSDGSR	78	GEDHDILTGYPI
7	PR004952	16	GFTFSSY	43	NSDGSR	81	GEDHDILTGYPV
8	PR004953	16	GFTFSSY	46	GYDGRN	82	HFPSLPGTTDTFDI
9	PR007242	16	GFTFSSY	48	NFDSSR	78	GEDHDILTGYPI
10	PR007243	16	GFTFSSY	49	SSAGSR	78	GEDHDILTGYPI
11	PR007244	16	GFTFSSY	50	DSRGSR	78	GEDHDILTGYPI
12	PR007245	16	GFTFSSY	51	SSDASR	78	GEDHDILTGYPI
13	PR007246	16	GFTFSSY	52	SSTGSR	78	GEDHDILTGYPI
14	PR007247	16	GFTFSSY	53	NPLGST	79	DFPVLGGSHFDFQH
15	PR007248	16	GFTFSSY	54	NHDSSR	78	GEDHDILTGYPI

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит каркасные области, среди которых HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 или 7, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 28–34, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 63–68, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 84 и 86-89.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 150–157 и SEQ ID NO: 159–165. Подробности см. в таблице b ниже.

Таблица b. Переменная область тяжелой цепи антитела, нацеливающегося на CLDN18.2

SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
150	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIN NDGSSTRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGN YERDYWGQGTLLTVSS
151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTLLTVSS
152	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHIN SDGSTTQYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFPVLG GSHFDFQHWGQGTLLTVSS
153	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYWMHWVRQVPGKGLVLSRISS DGNYSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDML TGYPVIRGQGTLLTVSS
154	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDM LTGYPVIRGQGTLLTVSS
155	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTLLTVSS
156	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRIN SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPVIRGQGTLLTVSS
157	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIG YDGRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMDNLRAEDTALYYCARHFPSLPG TTDTFDIRGPGTLLTVSS
159	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN FDSSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTLLTVSS
160	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS SAGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTLLTVSS

161	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRID SRGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPIRGQGTTVTVSS
162	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS SDASRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPIRGQGTTVTVSS
163	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS STGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPIRGQGTTVTVSS
164	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHIN PLGSTTQYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVLG GSHFDFQHWGQGLTVTVSS
165	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN HDSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPIRGQGTTVTVSS

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело дополнительно содержит константную область тяжелой цепи. Более предпочтительно константная область тяжелой цепи выбрана из hIgG1, hIgG2, hIgG3 и hIgG4 и их вариантов. Еще более предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой таковую из hIgG1.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, антитело в виде тяжелой цепи, или однодоменное антитело, или моноклональное или поликлональное антитело, полученные из антител, указанных выше.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой однодоменное антитело, содержащее аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 182–189 и SEQ ID NO: 191–197. Подробности см. в таблице с ниже.

Таблица с. Тяжелая цепь антитела, нацеливающегося на CLDN18.2

SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
-------------------	---

182	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIN NDGSSTRYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGN YERDYWGQGTLVTVSSGQAGQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
183	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPVIRGQGTITVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
184	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHIN SDGSTTQYADSVKGRFTISRDNANKMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFPVLG GSHFDFQHWGQGTITVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
185	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYWMHWVRQVPGKGLVLSRIS DGNYSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDM LTGYPVRGQGTITVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
186	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGRGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHD MLTGYPVRGQGTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>

187	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
188	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRI SDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPVRGQGATVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
189	<p>EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIG YDGRNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMDNLRAEDTALYYCARHFPSLP GTTDTDFDIRGPGTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
191	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI FDSSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
192	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI SAGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>

193	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRID SRGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGQTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
194	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS SDASRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGQTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
195	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS STGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGQTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
196	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHIN PLGSTTQYADSVKGRFTISRDNANKNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVLG GSHFDFQHWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
197	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIN HDSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGQTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>

В настоящем изобретении "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи и СН1 и вариабельной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи. Область "Fc" содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены СН1 и СН2 антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе двумя или более дисульфидными связями и гидрофобным взаимодействием доменов СН3. "Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи, содержащую домен VH и домен СН1, а также область между доменами СН1 и СН2 таким образом, что между двумя тяжелыми цепями двух фрагментов Fab' могут образовываться дисульфидные связи с получением молекулы F(ab')₂. "Фрагмент F(ab')₂" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами СН1 и СН2 таким образом, что между двумя тяжелыми цепями образуются межцепочечные дисульфидные связи. Таким образом, фрагмент F(ab')₂ состоит из двух Fab'-фрагментов, удерживаемых вместе дисульфидными связями между двумя тяжелыми цепями. Термин "Fv" относится к фрагменту антитела, который состоит из доменов VL и VH одиночного плеча антитела, но не содержит константной области.

В настоящем изобретении scFv (фрагмент одноцепочечного антитела) может представлять собой стандартное одноцепочечное антитело, известное из уровня техники, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи и короткий пептид из 15–20 аминокислот. В scFv домены VL и VH объединены в пару с образованием моновалентной молекулы посредством линкера, который обеспечивает образование ими единой полипептидной цепи [см., например, Bird et al, *Science* 242:423-426 (1988) и Huston et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)]. Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH₂-VL-линкер-VH-COOH или NH₂-VH-линкер-VL-COOH. Подходящий линкер из предшествующего уровня техники состоит из повторяющихся аминокислотных последовательностей G₄S или их варианта. Например, могут применяться линкеры, имеющие аминокислотную последовательность (G₄S)₄ или (G₄S)₃, но также может применяться их вариант.

Термин "полиспецифическое антитело" используется в самом широком смысле и охватывает антитела, характеризующиеся полиэпитопной специфичностью. Эти полиспецифические антитела включают без ограничения антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), при этом единица VH-VL характеризуется полиэпитопной специфичностью; антитело, имеющее две или более областей VL и VH, при этом каждая единица VH-VL связывается с другой мишенью или другим эпитопом одной и той же мишени; антитело, имеющее две или более одиночных вариабельных областей, при этом каждая одиночная вариабельная

область связывается с другой мишенью или другим эпитопом той же мишени; полноразмерные антитела, фрагменты антител, биспецифические антитела, триатела, фрагменты антител, связанные вместе ковалентно или нековалентно, и т. п.

Антитело по настоящему изобретению включает моноклональное антитело. Моноклональное антитело, или mAb, или Ab по настоящему изобретению относится к антителу, полученному из одиночной клональной линии клеток, которая не ограничена эукариотическими, прокариотическими или фаговыми клональными линиями клеток.

В настоящем изобретении "антитело в виде тяжелой цепи", также называемое HCAb, относится к антителу, содержащему только одну переменную область (VHH) и две стандартные области CH2 и CH3 тяжелой цепи.

В настоящем изобретении "однодоменное антитело", также называемое "нанотелом", относится к структуре VHH, клонированной из антитела в виде тяжелой цепи. Это наименьшая единица, которая, как известно, способна связываться с антигеном-мишенью.

Для решения вышеуказанных технических задач второй аспект настоящего изобретения предусматривает биспецифическое антитело, содержащее первую функциональную область белка, нацеливающуюся на CD3, и вторую функциональную область белка, нацеливающуюся на CLDN18.2; при этом

первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме VH и предпочтительно содержит 2 или 3 VH; если вторая функциональная область белка содержит 3 VH, связанные последовательно, то каждая из первой функциональной области белка и второй функциональной области белка связана с двойной цепью Fc; если вторая функциональная область белка содержит 2 VH, связанные последовательно, то каждая из первой функциональной области белка и второй функциональной области белка связана с двойной цепью Fc; если вторая функциональная область белка содержит 3 VH и одна из 3 VH связана с первой функциональной областью белка, то оставшиеся две VH связаны последовательно, и первая функциональная область белка и две связанные последовательно VH второй функциональной области белка связаны с двойной цепью Fc;

альтернативно первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме HCAb;

альтернативно первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме VH-HCAb, при этом вторая функциональная область белка предпочтительно содержит всего 4 VH.

В настоящем изобретении "первая" и "вторая" в первой функциональной области белка и второй функциональной области белка не имеют практического значения и используются

только для различения антигенсвязывающих доменов для разных мишеней. Одна функциональная область белка может содержать множество антигенсвязывающих доменов в одной и той же форме или в разных формах; антигенсвязывающие домены различных функциональных областей белка могут быть функционально связаны друг с другом, и различные антигенсвязывающие домены одной и той же функциональной области белка могут не быть связанными друг с другом.

Например, в настоящем изобретении первая функциональная область белка может представлять собой антигенсвязывающий домен, нацеливающийся на CD3, а вторая функциональная область белка может представлять собой антигенсвязывающий домен, нацеливающийся на CLDN18.2.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вторая функциональная область белка содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 16–18, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42–46 и SEQ ID NO: 48–54, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 77–82.

Более предпочтительно HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 77 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 79

соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 78 соответственно. Подробности см. в таблице d ниже.

Таблица d. Комбинация HCDR второй функциональной области белка биспецифического антитела

№	HCDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	№ антитела	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
1	PR004603	16	GFTFSSY	42	NNDGSS	77	APPYGNYERDY
2	PR005072, PR005354, PR005518, PR005519, PR005520, PR005521, PR005522, PR005525	16	GFTFSSY	43	NSDGSR	78	GEDHDILTYPI
3	PR005076	16	GFTFSSY	44	NSDGST	79	DFPVLGGSHFDF QH
4	PR005397, PR006384, PR006023	16	GFTFSSY	52	SSTGSR	78	GEDHDILTYPI
5	PR005398, PR007081	16	GFTFSSY	48	NFDSSR	78	GEDHDILTYPI
6	PR005399, PR007079	16	GFTFSSY	49	SSAGSR	78	GEDHDILTYPI
7	PR005401, PR007080	16	GFTFSSY	50	DSRGSR	78	GEDHDILTYPI
8	PR005411, PR006292, PR007083, PR006293	16	GFTFSSY	51	SSDASR	78	GEDHDILTYPI
9	PR005422	16	GFTFSSY	53	NPLGST	79	DFPVLGGSHFDF QH
10	PR007082	16	GFTFSSY	54	NHDSSR	78	GEDHDILTYPI

Еще более предпочтительно переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 150–152 и SEQ ID NO: 159–165, все из которых перечислены в таблице b.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения первая функциональная область белка содержит переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2

и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 131 соответственно, и переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 72 соответственно.

Предпочтительно переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO: 144, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 168.

Аминокислотная последовательность вышеуказанной первой функциональной области белка показана в таблице е ниже.

Таблица е. Аминокислотные последовательности, относящиеся к первой функциональной области белка биспецифического антитела

Первая функциональная область белка	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
HCDR переменной области тяжелой цепи	11	GFTFSTY	38	RSKYNNYA	72	HGNFGNSYVSWFAY
LCDR переменной области легкой цепи	101	RSSTGAVT TSNYAN	116	GTNKRAP	131	ALWYSNLWV
Первая функциональная область белка	SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности				
Переменная область тяжелой цепи	144	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS				
	149	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS				
Переменная область легкой цепи	168	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL				

Предпочтительно биспецифическое антитело содержит три полипептидные цепи в следующих формах:

два N-конца Fc связаны с Fab и VH соответственно; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3 или $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1-шарнир-CH2-CH3, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL;

альтернативно один C-конец HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VL_{CD3} -CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VL_{CD3} -CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1;

альтернативно N-конец тяжелой цепи Fab связан с одной $VH_{CLDN18.2}$, C-конец тяжелой цепи связан с одним N-концом Fc, и C-конец последовательно связанных VH связан с другим N-концом Fc; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}-VH_{CD3}$ -CH1-шарнир-CH2-CH3, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL.

Более предпочтительно различные функциональные единицы, такие как VH, CH2-CH3 и VL, функционально связаны линкерными пептидами, предпочтительно содержащими аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 244–248, предпочтительно последовательность, представленную под SEQ ID NO: 246. Подробности см. в таблице f.

Таблица f. Последовательности линкерных пептидов

SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности	Названия
244	GGGGS	GS_5
245	GGGGSGGGGS	GS_10
246	GGGGSGGGGS	GS_15
247	GGGGSGGGGS	GS_20
248	GGGGSGGGGS	GS_25

В одном варианте осуществления настоящего изобретения два N-конца Fc связаны с Fab и VH соответственно; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3 или $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1-шарнир-CH2-CH3, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; в отношении конкретных примеров см. структуры (1) и (7) из фиг. 4;

альтернативно один C-конец HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3-линкерный пептид- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3-линкерный пептид- VL_{CD3} -CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1; в отношении конкретных примеров см. структуры (2) и (3) из фиг. 4;

альтернативно один C-конец VH-HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3-линкерный пептид- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3-линкерный пептид- VL_{CD3} -CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1; в отношении конкретных примеров см. структуры (4) и (5) из фиг. 4;

альтернативно N-конец тяжелой цепи Fab связан с одной $VH_{CLDN18.2}$, C-конец тяжелой цепи связан с одним N-концом Fc , и C-конец последовательно связанных VH связан с другим N-концом Fc ; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир- $CH2$ - $CH3$, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- VH_{CD3} - $CH1$ -шарнир- $CH2$ - $CH3$, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} - CL ; в отношении конкретных примеров см. структуру (6) из фиг. 4.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 214, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 219, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 220, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 221, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 222, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 223, вторая полипептидная цепь

содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 239, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 240, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 241, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 242, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 243, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200.

Информация о последовательностях в конкретном вышеуказанном варианте осуществления показана в таблице g ниже.

Таблица g. Информация о последовательностях полипептидной цепи биспецифического антитела

SEQ ID NO:	Соответствующие последовательности
------------	------------------------------------

200	<p>QAVVTQEPSLTVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT NKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS</p>
209	<p>EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNF GNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
213	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGNF GNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
214	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIN NDGSSTRYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGN YERDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSYINNDGSSTRYADSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGNYERDYWGQGT LVTVSSASE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
219	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI</p>

	<p>LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISR NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
220	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHI NSDGSTTQYADSVKGRFTISRDNAMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVL GGSHFDFQHWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINSDGSTTQYADSVKGRF TISRDNAMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVLGGSHFDFQHWGQGTLL TVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
221	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS STGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTGSRTIYADSVKGRFTISRDN AMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
222	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS NFDSSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINFDSSRTIYADSVKGRFTISRDN AMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV</p>

	SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
223	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI SAGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSAGSRTIYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTITVTVSSASEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
224	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI DSRGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIIDSRGSRTIYADSVKGRFTISR NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTITVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
225	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI SDASRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDIL TGYPYRGGGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSDASRTIYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTITVTVSSASEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
226	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHI NPLGSTTQYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVL

	<p>GGSHFDFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINPLGSTTQYADSVKGRF TISRDNAMNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPVLGGSHFDFQHWGQGTLV TVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
227	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
228	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGG GSRTEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV SRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</p>
229	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNG NSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSC</p>
230	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL</p>

	<p>MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGG GSRTQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS</p>
231	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISR NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSRTEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SC</p>
232	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISR NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGSRRTQAVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL</p>

	<p>LGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>
233	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>
234	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDN NAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQV PGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
235	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNF GNSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTK</p>

	NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISDASRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPPIRGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISDASRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPPIRGQGTITVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
237	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
238	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPPIRGQGTITVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
239	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS SAGSRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPPIRGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIS SAGSRTIYADSVKGRFTISRDN

	AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPYRGGQTTVTVSSASEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
240	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI DSRGSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI DSRGSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPYRGGQTTVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
241	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NFDSSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NFDSSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPYRGGQTTVTVSSASEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NHDSSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDI LTGYPIRGQGT TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRI NHDSSRTIYADSVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPYRGGQTTVTVSSASEPK SSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSD

	I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
243	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M H W V R Q V P G K G L V W V C R I S S D A S R T I Y A D S V K G R F T C S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G E D H D I L T G Y P I R G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W M H W V R Q V P G K G L V W V C R I S S D A S R T I Y A D S V K G R F T C S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G E D H D I L T G Y P I R G Q G T T V T V S S A S E P K S S D K T H T C P P C P A P E A A G A P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R E E M T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

Для решения вышеуказанных технических задач третий аспект настоящего изобретения предусматривает выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения.

Способ получения нуклеиновой кислоты представляет собой стандартный способ получения в данной области техники и предпочтительно включает следующие стадии: получение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеуказанное антитело, с помощью технологии клонирования генов или получение молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеуказанное антитело, с помощью искусственного синтеза полной последовательности.

Специалистам в данной области техники известно, что замены, делеции, изменения, вставки или добавления могут быть соответствующим образом введены в последовательность оснований, кодирующую аминокислотную последовательность вышеуказанного антитела, с получением гомолога полинуклеотида. Гомолог полинуклеотида по настоящему изобретению может быть получен посредством замены, делеции или добавления, осуществляемых в отношении одного или нескольких оснований гена, кодирующего последовательность антитела, в диапазоне, в котором сохраняется активность антитела.

Для решения вышеуказанных технических задач четвертый аспект настоящего изобретения предусматривает рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения. Рекомбинантный вектор экспрессии может быть получен с применением способов, являющихся стандартными в данной области техники, т. е. путем связывания

молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению с различными векторами экспрессии. Вектор экспрессии представляет собой любой вектор, являющийся стандартным в данной области техники, при условии, что он может нести вышеупомянутую молекулу нуклеиновой кислоты.

Предпочтительно рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой плазмиду, космиду, фаг или вирусный вектор, при этом вирусный вектор предпочтительно представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса.

Для решения вышеуказанных технических задач пятый аспект настоящего изобретения предусматривает трансформант, содержащий рекомбинантный вектор экспрессии в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, в клетке-хозяине; предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку TG1, BL21 *E. coli* или клетку СНО-К1.

Рекомбинантный трансформант для экспрессии может быть получен с применением способов, являющихся стандартными в данной области техники, например путем трансформации вышеуказанного рекомбинантного вектора экспрессии в клетку-хозяина. Клетка-хозяин представляет собой любую клетку-хозяина, являющуюся стандартной в данной области техники, при условии, что она может обеспечивать стабильную репликацию вышеуказанного рекомбинантного вектора экспрессии и при этом нуклеиновая кислота, которую он несет, может эффективно экспрессироваться. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку TG1 или BL21 *E. coli* (экспрессирующую одноцепочечное антитело или Fab-антитело) или клетку СНО-К1 (экспрессирующую полноразмерное антитело класса IgG). Предпочтительный рекомбинантный трансформант для экспрессии по настоящему изобретению может быть получен путем трансформации вышеупомянутой рекомбинантной плазмиды для экспрессии в клетку-хозяина. Способ трансформации представляет собой способ трансформации, являющийся стандартным в данной области техники, предпочтительно способ на основе химической трансформации, способ на основе теплового шока или способ на основе электрической трансформации.

В настоящем изобретении антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, можно использовать для получения химерного антигенного рецептора (CAR) или подобного, чтобы модифицировать его на клетках, таких как Т-клетки или NK-клетки. Таким образом, шестой аспект настоящего изобретения предусматривает химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения.

Например, химерный антигенный рецептор может содержать следующую структуру: (a) внеклеточный связывающий домен scFv, который специфически распознает CLDN18.2; (b) шарнирный домен; (c) трансмембранный домен; (d) костимулирующий внутриклеточный домен и (e) сигнальный домен; где внеклеточный связывающий домен содержит антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Для решения вышеуказанных технических задач седьмой аспект настоящего изобретения предусматривает генетически модифицированную клетку, содержащую антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения. Предпочтительно генетически модифицированная клетка представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно выделенную клетку человека и более предпочтительно иммунную клетку, такую как Т-клетка или НК-клетка.

Для решения вышеуказанных технических задач восьмой аспект настоящего изобретения предусматривает способ получения биспецифического антитела, включающий культивирование трансформанта в соответствии пятым аспектом настоящего изобретения и получение антитела или биспецифического антитела из культуры.

Для решения вышеуказанных технических задач девятый аспект настоящего изобретения предусматривает конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий цитотоксическое средство и антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения; предпочтительно цитотоксическое средство представляет собой MMAF или MMAE.

Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство может представлять собой способ, являющийся стандартным в данной области техники, и предпочтительно способ получения, описанный в Doronina, 2006, *Bioconjugate Chem.* 17, 114–124. Предпочтительно с помощью способа получения получают конъюгаты антитело-лекарственное средство с минимальной низкой фракцией конъюгата (LCF), составляющей менее 10%.

Конъюгат антитело-лекарственное средство может присутствовать в любой физической форме, известной в данной области техники, предпочтительно в виде прозрачного раствора.

Для решения вышеуказанных технических задач десятый аспект настоящего изобретения предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

Для решения вышеуказанных технических задач одиннадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает применение антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, или биспецифического антитела в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, или фармацевтической композиции в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения заболевания, ассоциированного с CD3 и/или CLDN18.2;

заболевание предпочтительно представляет собой рак, при этом рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак почки, меланому, рак легкого, рак желудка, рак печени, рак пищевода, рак шейки матки, опухоль головы и шеи, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак мочевого пузыря, саркому или колоректальный рак; предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак почки или холангиокарциному; более предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы.

Для решения вышеуказанных технических задач двенадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает набор, содержащий антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, химерный антигенный рецептор в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, генетически модифицированную клетку в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения, или конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения, или фармацевтическую композицию в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения;

предпочтительно набор дополнительно содержит (i) устройство для введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или фармацевтической композиции и/или (ii) инструкции.

Для решения вышеуказанных технических задач тринадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает набор из частей, содержащий набор А и набор В, где

набор А содержит антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифическое антитело в соответствии со вторым аспектом настоящего

изобретения, химерный антигенный рецептор в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, генетически модифицированную клетку в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения и/или фармацевтическую композицию в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения;

набор В содержит другие противоопухолевые антитела или фармацевтическую композицию, содержащую другие противоопухолевые антитела, и/или одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

Набор А и набор В можно применять одновременно, или набор А можно применять до применения набора В, или набор В можно применять до применения набора А. Последовательность применения определяется в соответствии с фактическими требованиями в конкретном применении.

Для решения вышеуказанных технических задач четырнадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает способ диагностики, лечения и/или предупреждения CLDN18.2-опосредованного заболевания или нарушения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифического антитела в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, химерного антигенного рецептора в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения, или лечения пациента, нуждающегося в этом, с использованием набора из частей в соответствии с тринадцатым аспектом настоящего изобретения.

Предпочтительно заболевание или нарушение представляет собой опухоль, предпочтительно CLDN18.2-положительную опухоль, и более предпочтительно рак желудка, рак пищевода, рак легкого, рак яичника, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, бронхиальную карциному, глиому и/или лейкоз.

Термин "CLDN18.2-положительный", используемый в настоящем изобретении, относится к сверхэкспрессии белка CLDN18.2, например, CLDN18.2-положительная клетка линии клеток NUGC4_D8; в противном случае ее называют "CLDN18.2-отрицательной".

Для решения вышеуказанных технических задач пятнадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает способ иммунологического выявления или определения CLDN18.2, включающий применение антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифического антитела в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, химерного антигенного рецептора в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения. Предпочтительно выявление осуществляют в целях, отличных от диагностических и/или терапевтических.

Для решения вышеуказанных технических задач шестнадцатый аспект настоящего изобретения предусматривает комбинированную терапию, предусматривающую введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или биспецифического антитела в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, химерного антигенного рецептора в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения, конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии с девятым аспектом настоящего изобретения или фармацевтической композиции в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения и второго терапевтического средства; при этом второе терапевтическое средство предпочтительно предусматривает другие противоопухолевые антитела или фармацевтическую композицию, содержащую другие противоопухолевые антитела, и/или одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

В настоящей заявке все аминокислотные последовательности перечисленных CDR показаны в соответствии со схемой Chothia (последовательности в формуле изобретения в составе настоящего изобретения также показаны в соответствии со схемой Chothia). Однако специалистам в данной области техники хорошо известно, что CDR антитела в данной области техники могут быть определены с применением различных способов, таких как схема Kabat на основе вариабельности последовательностей (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, National Institutes of Health (U.S.), Бетесда, США, Мэриленд (1991)) и схема Chothia на основе расположения областей структурных петель (см. *J Mol Biol* 273: 927-48, 1997). В настоящей заявке комбинированная схема, предусматривающая схему Kabat и схему Chothia, также может использоваться для

определения аминокислотных остатков в последовательности переменного домена. Комбинированная схема сочетает в себе схему Kabat со схемой Chothia с получением большего диапазона. Подробности см. в таблице 1. Специалистам в данной области техники будет понятно, что если не указано иное, то термины "CDR" и "область, определяющая комплементарность" данного антитела или его области (например, переменной области) рассматриваются как охватывающие области, определяющие комплементарность, как определено с помощью любой из вышеизложенных известных схем, описанных в данном документе. Хотя объем, заявленный в формуле изобретения, охватывает последовательности, показанные на основе схемы Chothia, аминокислотные последовательности, соответствующие другим схемам с определением CDR, также должны подпадать под объем настоящего изобретения.

Таблица 1. Схема определения для CDR антитела по настоящему изобретению (см. <http://bioinf.org.uk/abs/>)

	Kabat	Chothia	Объединенная
VL CDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
VL CDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
VL CDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
VH CDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
VH CDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
VH CDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

В схеме Chothia Laa-Lbb может относиться к аминокислотной последовательности от положения aa до положения bb, начинающейся на N-конце легкой цепи антитела; и Наа-Nbb может относиться к аминокислотной последовательности от положения aa до положения bb, начинающейся на N-конце тяжелой цепи антитела. Например, L24-L34 может относиться к аминокислотной последовательности от положения 24 до положения 34 в соответствии со схемой Chothia, начинающейся на N-конце легкой цепи антитела; H26-H32 может относиться к аминокислотной последовательности от положения 26 до положения 32 в соответствии со схемой Chothia, начинающейся на N-конце тяжелой цепи антитела. Специалистам в данной области техники хорошо известно, что в нумерации CDR по схеме Chothia существуют положения, в которых присутствуют сайты вставки.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в данном документе научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Кроме того, используемые в данном документе лабораторные операции из области культуры клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии являются общепринятыми процедурами, широко используемыми в

соответствующих областях. Кроме того, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже представлены определения и пояснения соответствующих терминов.

Трехбуквенные коды и однобуквенные коды для аминокислот, используемые в настоящем изобретении, известны специалистам в данной области техники или описаны в *J. Biol. Chem*, 243, p3558 (1968).

Используемый в данном документе термины "включать/включает/включающий" или "содержать/содержит/содержащий" предназначены для обозначения того, что композиция и способ включают описанные элементы, но не исключают другие элементы; но также включен случай "состоять/состоит/состоит из", если это обусловлено контекстом.

Термин "CLDN18.2" включает изоформы, CLDN18.2 млекопитающих (например, человека), видовые гомологи CLDN18.2 человека и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с CLDN18.2. Аминокислотная последовательность CLDN18.2 (например, CLDN18.2 человека) известна из уровня техники, как показано в базе данных NCBI.

Термин "CLDN18.1" включает изоформы, CLDN18.1 млекопитающих (например, человека), видовые гомологи CLDN18.1 человека и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с CLDN18.1. Аминокислотная последовательность CLDN18.1 (например, CLDN18.1 человека) известна из уровня техники, как показано в базе данных NCBI.

Термин "эпитоп" относится к фрагментам антигена (например, CLDN18.2 человека), которые специфически взаимодействуют с молекулой антитела. Термин "конкурентный" в настоящем изобретении относится к способности молекулы антитела препятствовать связыванию молекулы антитела к CLDN18.2 с мишенью (например, CLDN18.2 человека). Препятствование связыванию может быть непосредственным или опосредованным (например, посредством аллостерической модуляции молекулы антитела или мишени). Анализы конкурентного связывания (например, анализы методом FACS, анализы методом ELISA или BIACORE) можно использовать для определения степени, в которой молекула антитела способна препятствовать связыванию другой молекулы антитела с ее мишенью.

Термин "антитело", используемый в настоящем изобретении, включает иммуноглобулин, который представляет собой структуру из четырех цепей, образованную посредством соединения двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей с помощью межцепочечных дисульфидных связей. Иммуноглобулины различаются по аминокислотному составу и расположению их константных областей тяжелой цепи, а следовательно по их антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять классов или изоформ иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, при этом

их соответствующими тяжелыми цепями являются цепи μ , δ , γ , α и ϵ соответственно. Ig одного и того же класса можно разделить на различные подклассы в соответствии с различиями аминокислотного состава шарнирных областей и количества и расположения дисульфидных связей в тяжелых цепях; например IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи подразделяются на цепи κ или λ по различию в константных областях. Каждый из пяти классов Ig может иметь κ -цепь или λ -цепь.

В настоящем изобретении переменная область легкой цепи антитела по настоящему изобретению может дополнительно содержать константную область легкой цепи, содержащую κ - или λ -цепь человека или их вариант. В настоящем изобретении переменная область тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, предусматривающую IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 человека или их вариант.

Последовательности из приблизительно 110 аминокислот тяжелой и легкой цепей антитела вблизи N-конца значительно варьируют и поэтому называются переменными областями (V-областями); остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и поэтому называются константными областями (C-областями). Переменные области содержат 3 гиперпеременные области (HVR) и 4 каркасные области (FWR) с относительно консервативными последовательностями. Специфичность антитела определяют 3 гиперпеременные области и поэтому они также известны как области, определяющие комплементарность (CDR). Каждая переменная область легкой цепи (VL) или переменная область тяжелой цепи (VH) состоит из 3 областей CDR и 4 областей FWR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 и FWR4. 3 области CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3; 3 области CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью "J", состоящей из приблизительно 12 или больше аминокислот, и тяжелая цепь дополнительно содержит область "D", состоящую из приблизительно 3 или больше аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым

компонентом (C1q) классической системы комплемента. VH- и VL-области можно далее подразделить на гипервариабельные области (называемые областями, определяющими комплементарность (CDR)), между которыми распределены консервативные области, называемые каркасными областями (FWR). Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FWR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 и FWR4. Соответствующие вариабельные области (VH и VL) каждой тяжелой цепи/легкой цепи образуют участок связывания антитела соответственно. В частности, тяжелая цепь может также содержать 3 или больше CDR, например 6, 9 или 12 CDR. Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению тяжелая цепь может представлять собой ScFv с N-концом из тяжелой цепи антитела класса IgG, связанным с другим антителом, и в данном случае тяжелая цепь содержит 9 CDR.

Термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие вариабельные и константные области человеческих последовательностей иммуноглобулина зародышевого типа. Человеческое антитело по настоящему изобретению может включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулина зародышевого типа (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-направленного мутагенеза *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты в человеческие каркасные последовательности (т. е. "гуманизированные антитела").

Как используется в данном документе, термин "специфический" в отношении антитела означает, что антитело распознает специфический антиген, но по сути не распознает и не связывается с другими молекулами в образце. Например, антитело, которое специфически связывается с антигеном из одного вида, может также связываться с антигеном из одного или нескольких видов. Однако такая межвидовая перекрестная реактивность сама по себе не изменяет классификацию антител по специфичности. В другом примере антитело, которое специфически связывается с антигеном, может также связываться с антигеном в других аллельных формах. Однако такая перекрестная реактивность сама по себе не изменяет классификацию антител по специфичности. В некоторых случаях термины "специфичность" или "специфическое связывание" могут использоваться для обозначения взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, что означает то, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа) в химическом веществе; например, антитело обычно распознает и связывает определенную белковую структуру, а не белок. Если

антитело является специфическим в отношении эпитопа "А", то в реакционной смеси, содержащей меченый "А" и антитело, присутствие молекулы, содержащей эпитоп А (или свободного, немеченого А), уменьшит количество меченого А, связанного с антителом.

Термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR", используемый в данном документе, включает внеклеточные домены (внеклеточные связывающие домены), шарнирные домены, трансмембранные домены (трансмембранные области), способные связываться с антигенами и полипептидами, которые вызывают передачу цитоплазматического сигнала в домен (т. е. внутриклеточный сигнальный домен). Шарнирный домен можно рассматривать как часть, обеспечивающую гибкость внеклеточной антигенсвязывающей области. Внутриклеточный сигнальный домен относится к белку, который передает информацию в клетку посредством определенного сигнального пути путем генерирования второго мессенджера для регулирования активности клетки, или к белку, который функционирует как эффектор, соответствующий такому мессенджеру. Он генерирует сигнал, который может стимулировать иммунную эффекторную функцию клетки с CAR (например, CART-клетки). Внутриклеточный сигнальный домен включает сигнальный домен и может также включать костимулирующий внутриклеточный домен, полученный из костимулирующей молекулы.

"Гомология", "вариант последовательности" или "мутация" относятся к сходству последовательностей между двумя полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидными последовательностями. Если все позиции в двух сравниваемых последовательностях заняты одной и той же мономерной субъединицей основания или аминокислоты, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы являются гомологичными в данном положении. Процентное значение идентичности между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений $\times 100\%$. Например, при оптимальном выравнивании последовательностей если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, то две последовательности гомологичны на 60%. Обычно сравнение проводится, когда две выровненные последовательности дают наибольшее процентное значение идентичности. "Оптимизация" относится к мутации, при которой связывание антитела с антигеном поддерживается или улучшается. В настоящем изобретении это относится к мутации, при которой связывание с CLDN18.2 поддерживается, сохраняется или улучшается.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" (если он однониточный) используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо. Термины "нуклеиновая кислота",

"последовательность нуклеиновой кислоты", "нуклеотидная последовательность" или "полинуклеотидная последовательность" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо.

Термин "мутация" включает замены, добавления и/или делеции аминокислот или нуклеотидов. "Аминокислотная замена" и "консервативная аминокислотная замена" представляют собой замену аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком и замену аминокислотным остатком с аналогичными боковыми цепями соответственно.

Используемый в данном документе термин "лентивирус" относится к роду семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными среди ретровирусов и способны инфицировать неделящиеся клетки; они способны доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина и, таким образом, являются одними из наиболее эффективных способов доставки генов векторами. HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов. Векторы, полученные из лентивирусов, обеспечивают средства для достижения горизонтального переноса значительного количества генетической информации *in vivo*.

Термин "вектор", используемый в данном документе, означает композицию, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту и пригодна для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известно много векторов. Они включают без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, ассоциированные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующиеся плазмиды или вирусы. Данный термин также следует понимать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновых кислот в клетки, такие как соединения полилизина и липосомы. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы и т. д.

Выражения "клетка" и "линия клеток", используемые в настоящем изобретении, используются взаимозаменяемо, и при этом все такие обозначения включают потомство. Термин "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую может быть введен вектор, включая без ограничения прокариотические клетки, такие как *E. coli*, клетки грибов, такие как дрожжевые клетки, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки СНО, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

Термин "трансфекция" относится к введению экзогенной нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку. Трансфекция может осуществляться различными способами, известными из уровня техники, включая соосаждение фосфата кальция и ДНК,

трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную полибренном, электропорацию, микроинъекцию, слияние липосом, липофекцию, слияние протопластов, ретровирусную инфекцию и биолистику.

Термин "иммунная клетка" относится к клетке, которая может вызывать иммунный ответ. Слово "иммунная клетка" и другие его грамматические варианты могут относиться к иммунной клетке любого происхождения. "Иммунная клетка" включает, например, белые кровяные тельца (лейкоциты) и лимфоциты (Т-клетки, В-клетки и естественные киллерные (NK) клетки), происходящие из гемопоэтических стволовых клеток (HSC), продуцируемых в костном мозге, и клетки, происходящие из костного мозга (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки). Термин "иммунная клетка" может также относиться к иммунной клетке человека или животного, отличного от человека.

Используемый в данном документе термин "Т-клетка" относится к классу лимфоцитов, которые созревают в тимусе. Т-клетки играют важную роль в клеточном иммунитете и отличаются от других лимфоцитов (например, В-клеток) тем, что Т-клеточные рецепторы присутствуют на поверхности клеток. "Т-клетка" включает все типы иммунных клеток, которые экспрессируют CD3, включая Т-хелперные клетки (клетки CD4+), цитотоксические Т-клетки (клетки CD8+), естественные киллерные Т-клетки, Т-регуляторные клетки (Treg) и γ - δ Т-клетки. "Цитотоксические клетки" включают CD8+ Т-клетки, естественные киллерные (NK) клетки и нейтрофилы, которые способны опосредовать цитотоксический ответ. Используемый в данном документе термин "NK-клетка" относится к классу лимфоцитов, которые происходят из костного мозга и играют важную роль во врожденной иммунной системе. NK-клетки обеспечивают быстрый иммунный ответ против инфицированных вирусом клеток, опухолевых клеток или других клеток, подвергшихся стрессу, даже в случае отсутствия антител и главных комплексов гистосовместимости на поверхности клеток.

Например, иммунные клетки могут быть получены из крови, такие как аутологичные Т-клетки, аллогенные Т-клетки, аутологичные NK-клетки и аллогенные NK-клетки, или из линий клеток, таких как линии NK-клеток, полученные путем инфицирования вирусом EBV, NK-клетки, полученные путем индуцированной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и iPSC, а также линии клеток NK92.

Термины "необязательный", "необязательно", "любой" или "любой из" означают, что описанное далее событие или обстоятельство могут, но не обязательно, происходить, и что описание включает случаи, когда это событие или обстоятельство происходят или не происходят. Например, "необязательно содержащий 1 переменную область тяжелой цепи антитела" означает, что переменная область тяжелой цепи антитела конкретной

последовательности может, но не обязательно, присутствовать. Используемые в данном документе формы единственного числа используются в настоящем изобретении для обозначения одного или нескольких грамматических объектов. Если иное конкретно не указано в содержании, то термин "или" используется в настоящем изобретении для обозначения термина "и/или" и является взаимозаменяемым с ним. "Приблизительно" и "примерно" обычно означают приемлемую степень погрешности измеренной величины с учетом характера или точности измерения. Иллюстративные степени погрешности обычно находятся в пределах 10% и более типично в пределах 5% от значения измеренной величины. Способ и композиция, раскрытые в настоящем изобретении, охватывают полипептиды и нуклеиновые кислоты, имеющие указанную последовательность, вариантную последовательность или последовательность, по сути идентичную ей или сходную с ней, например последовательность, которая на по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 99% или больше идентична указанной последовательности. В контексте аминокислотных последовательностей термин "по сути идентичный" используется в настоящем изобретении для обозначения первой аминокислотной последовательности.

Как используется в данном документе, термин EC_{50} относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, т. е. концентрации, которая может вызывать 50% максимального эффекта.

Как используется в данном документе, термины "конъюгат антитело-лекарственное средство" и "ADC" используются взаимозаменяемо.

Ауристин представляет собой полностью синтетическое лекарственное средство, химическую структурную формулу которого относительно легко модифицировать для оптимизации его физических свойства и пригодности для разработки лекарственных средств. Производные ауристина, используемые для конъюгации с антителами, включают главным образом монометилауристин Е (ММАЕ) и монометилауристин F (ММАF), при этом первый синтезируется путем добавления 2-амино-1-фенилпропил-1-ола к С-концу синтетического пентапептида, полученного из природного ингибитора тубулиновой полимеразы доластатина-10. Ингибирующая активность ММАЕ в отношении различных линий опухолевых клеток человека составляет менее чем один наномоль. Чтобы снизить цитотоксическую активность ММАЕ, к С-концу доластатина-10 добавляют фенилаланин с получением ММАF. Способность ММАF проходить через клеточную мембрану является плохой из-за введенного в его структуру карбоксила. Следовательно, биологическая активность в отношении клеток значительно снижается, но ингибирующая активность в отношении клеток значительно повышается после конъюгации с антителом (US7750116).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-цитотоксическое лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват содержит антитело по настоящему изобретению, конъюгированное с одной или несколькими молекулами майтанзиноида. Майтанзиноиды представляют собой ингибиторы митоза, которые дезактивируют тубулин путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин был первоначально выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Впоследствии было обнаружено, что определенные микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и майтанзиноловый уксус C-3 (патент США № 4151042). Модули лекарственных средств на основе майтанзиноидов являются привлекательными модулями лекарственных средств в конъюгатах антитело-лекарственное средство, поскольку: (i) их относительно легко получить путем ферментации, или химической модификации, или дериватизации продукта ферментации; (ii) их легко дериватизировать с помощью функциональных групп, подходящих для конъюгации с антителами через линкеры, отличные от дисульфидных; (iii) стабильны в плазме крови и (iv) эффективны для различных линий опухолевых клеток. Соединения майтанзина, подходящие для использования в качестве модулей лекарственных средств на основе майтанзиноидов, хорошо известны из уровня техники и могут быть выделены из природных источников в соответствии с известными способами или получены с применением методик геной инженерии (см. Yu et al. (2002) *PNAS* 99: 7968-7973). Майтанзинол и аналоги майтанзинола также можно получать синтетически в соответствии с известными способами. Иллюстративные варианты осуществления модулей лекарственных средств на основе майтанзиноидов включают DM1, DM3 и DM4, как описано в данном документе.

Способ, композицию и комбинированную терапию по настоящему изобретению можно объединять с другими активными средствами или терапевтическими методами, при этом способ включает введение субъекту молекулы антитела к CLDN18.2 по настоящему изобретению в количестве, которое является эффективным в лечении или предупреждении заболеваний (например, рака), необязательно в комбинации с одним или несколькими ингибиторами PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, CTLA-4, антителом к Tim-3 (иммунотерапия) или другими антителами для терапии опухолей, антителами к Her-2, EGFR, VEGF, VEGFR и т. д., а также ADC (например, T-DM1), биспецифическими антителами, химиотерапевтическими средствами и т. д., и дополнительно включает введение молекулы антитела к CLDN18.2, дополнительного активного средства или всего перечисленного в количестве или дозе, которые выше, ниже или равны количеству или дозе для каждого активного средства в случае применения отдельно (например, в качестве монотерапии).

Количество или доза антитела к CLDN18.2, дополнительного активного средства или всех введенных веществ является, например, на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% ниже, чем количество или доза для каждого активного средства в случае применения отдельно (например, в качестве монотерапии).

Кроме того, как описано в примерах настоящего изобретения, антитело к CLDN18.2 и конъюгат лекарственное средство-антитело к CLDN18.2 могут связываться с CLDN18.2, индуцируя апоптоз клеток-мишеней (опухолевых клеток) с обеспечением подавления роста опухолевых клеток и усиления у эффекторных клеток эффектов уничтожения в виде ADCC и CDC в отношении опухолевых клеток *in vivo* с достижением таким образом цели лечения пациентов с раком. Таким образом, в определенных вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 и конъюгат лекарственное средство-антитело к CLDN18.2, описанные в настоящем изобретении, демонстрируют противоопухолевые эффекты антитела по настоящему изобретению, а также способы подавления роста опухолевых клеток, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CLDN18.2 и конъюгата лекарственное средство-антитело к CLDN18.2 по настоящему изобретению посредством этих механизмов. Способ является применимым для лечения рака *in vivo*. Для достижения целевого специфического терапевтического эффекта молекулу антитела к CLDN18.2 можно вводить вместе с другими антителами. При введении антитела к CLDN18.2 и конъюгата лекарственное средство-антитело к CLDN18.2 в комбинации с одним или несколькими активными средствами комбинацию можно вводить в любом порядке или одновременно пациенту с определенным типом рака, в частности пациенту с опухолью, характеризующейся высокой экспрессией CLDN18.2. В определенных аспектах предусмотрено лечение (например, уменьшение или ослабление) гиперпролиферативного симптома или заболевания (например, рака) у субъекта. Способ включает введение субъекту одного или нескольких антител к CLDN18.2 или конъюгатов лекарственное средство-антитела к CLDN18.2 по настоящему изобретению либо по отдельности, либо в комбинации с другими активными средствами или терапевтическими методами.

Молекулу антитела к CLDN18.2 отдельно или в комбинации с другим иммуномодулирующим средством (например, молекулами антител к LAG-3, к Tim-3, к PD-L или к PD-L1 и к CTLA-4) применяют для лечения рака желудка, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака пищевода, рака яичника и т. д. Молекулу антитела к CLDN18.2 можно вводить в комбинации с одним или несколькими из средств стратегии на основе иммунитета, целенаправленно воздействующего лекарственного средства (например, ингибитора VEGF, такого как моноклональное антитело к VEGF); ингибиторов

тирозинкиназы VEGF, таких как сунитиниб, сорафениб и апатиниб; ингибиторов RNAi или ингибиторов расположенных далее в цепи передачи сигнала медиаторов передачи сигналов VEGF, например ингибиторов мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR).

Как используется в данном документе, термины "рак", "пациент с раком" предназначены для включения всех типов раковых образований или онкогенных процессов, метастатических тканей или злокачественно трансформированных клеток, тканей или органов, независимо от их гистопатологических типов или стадий инвазивности. Примеры включают без ограничения солидные опухоли, гематологический рак, опухоли мягких тканей и метастатические очаги.

Неограничивающие примеры видов рака, которые можно подходящим образом лечить с применением антитела, нацеливающегося на CLDN18.2, раскрытого в настоящем изобретении, включают рак желудка, рак пищевода, рак легкого, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, глиому и/или лейкоз и т. п. или их метастатические очаги.

Вышеупомянутые предпочтительные условия можно объединять произвольно с получением предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения на основе общих знаний в данной области техники.

Реагенты и исходные материалы, применяемые в настоящем изобретении, являются коммерчески доступными.

Благоприятные эффекты настоящего изобретения заключаются в следующем.

1. В настоящем изобретении описаны HCAb-антитела к CLDN18.2 с превосходной аффинностью, специфичностью и эндоцитарной активностью. Антитело представляет собой совершенно новое, полностью человеческое антитело, содержащее только "тяжелую цепь" с молекулярной массой, которая составляет лишь приблизительно половину от молекулярной массы стандартного антитела класса IgG. Благодаря отсутствию легкой цепи антитело можно применять для разработки биспецифических антител, что позволяет избежать распространенных проблем, касающихся несоответствия легкой цепи и гетеродимеризации при разработке биспецифических антител. Оно также имеет потенциал для развития в ADC. В определенных предпочтительных вариантах осуществления HCAb-антитело характеризуется высокой аффинностью в отношении опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2, и может индуцировать высокую эндоцитарную активность по сравнению с аналогом IMAB362.

2. В настоящем изобретении также описаны биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 с превосходной активностью в виде TDCC *in vitro* и лекарственным эффектом *in vivo*. Биспецифическое антитело по настоящему изобретению характеризуется

наличием активности специфического связывания с CLDN18.2 и характеризуется наличием лучшего эффекта уничтожения в отношении опухолевых клеток, чем запатентованный аналог биспецифического антитела от Amgen. В определенных предпочтительных вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет фрагмент Fc и, таким образом, сохраняет эффект связывания Fc с FcRn; при этом предпочтительным является мутантный Fc, поскольку таким образом обеспечивается ослабление связывания с FcγR и следовательно активации неспецифических T-клеток, вызываемой перекрестным связыванием FcγR. Активность CD3-концов оптимизирована таким образом, чтобы можно было снизить высвобождение общих цитокинов при CRS, таких как IL6 и TNFα. Концы CLDN18.2 представлены в форме соединенных последовательно VHH, что дает возможность избежать общераспространенной проблемы, касающейся несоответствия легких и тяжелых цепей, сохраняя превосходную гидрофильность и улучшая селективность в отношении опухолевых клеток с высокой экспрессией CLDN18.2. Антитело характеризуется хорошей стабильностью *in vivo* и длительным периодом полужизни *in vivo* и демонстрирует высокую противоопухолевую активность *in vivo*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 a–f показана аффинность связывания HCAВ-антител в отношении клеток NUGC4_D8 (a–b), SNU601 (c), HEK293/hCLDN18.2 (d) и HEK293/hCLDN18.1 (e–f).

На фиг. 2 a–b показана активность конкурентного связывания HCAВ-антител в отношении (a) PR000400 и (b) PR004549 для клеток HEK293/hCLDN18.2.

На фиг. 3 a–b показана жизнеспособность клеток-мишеней при совместном культивировании с тестируемыми антителами и MMAF-спаренным антителом к IgG человека.

На фиг. 4 a–h показаны структуры биспецифических антител к CLDN18.2×CD3.

На фиг. 5 a–s показана аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток (a–c) HEK293/hCLDN18.2, (d–i) NUGC4_D8, (j–o) Jurkat и (p–s) HEK293/hCLDN18.1.

На фиг. 6 a–w показаны (a) выход экспрессии CLDN18.2, обеспечиваемый клетками IM95, и активность в виде TDCC биспецифических антител в отношении клеток (b–k) NUGC4_D8, (l–o) IM95, (p–s) HEK293/hCLDN18.1 и (t–w) SNU620.

На фиг. 7 показана аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток, сверхэкспрессирующих белок паралогичного семейства CLDN18.2 человека CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9.

На фиг. 8 а–с показана аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток (а) HEK293/cynoCLDN18.1, (b) HEK293/cynoCLDN18.2 и (с) CD3+ Т-клеток яванского макака.

На фиг. 9 показана активность в виде TDCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 к клеткам HEK293/cynoCLDN18.2 посредством Т-клеток яванского макака.

На фиг. 10 а–b показано высвобождение цитокинов, индуцированное биспецифическими антителами к CLDN18.2×CD3 *in vitro* (а) TNF α и (b) IL-6.

На фиг. 11 а–b показана активность в виде ADCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 к клеткам (а) Jurkat и (b) NUGC4_D8.

На фиг. 12 а–b показана активность в виде CDC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 к клеткам (а) HEK293/hCLDN18.2 и (b) Jurkat.

На фиг. 13 а–b показана конкурентная активность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 к (а) PR000400 и (b) PR004549 в отношении клеток HEK293/hCLDN18.2.

На фиг. 14 показана фармакокинетика биспецифических антител к CLDN18.2×CD3.

На фиг. 15 а–е показаны исследования фармакодинамики *in vivo* в моделях опухолей (а–b) NUGC4_D8 PBMC, (с) SNU620 PBMC и (d) HuP-T4 PBMC, а также (е) исследование цитокинового шторма *in vivo* на биспецифических антителах к CLDN18.2×CD3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано нижеследующими примерами, которые не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Экспериментальные процедуры без указанных условий в нижеследующих примерах осуществлялись в соответствии со стандартными процедурами и условиями или в соответствии с инструкциями.

Пример 1. Получение вектора экспрессии и стабильно трансфицированных линий клеток, а также иммунизация мышей

1.1. Получение вектора экспрессии для иммунизации мышей

Вектор экспрессии CLDN18.2 человека для иммунизации полностью гуманизированных трансгенных мышей получали следующим образом: синтезировали последовательность cDNA, кодирующую CLDN18.2 человека (Uniprot ID P56856-iso2), и кодирующую последовательность гена CLDN18.2 человека клонировали в плазмиду pCAGGS (YOUBIO, VT1076) путем ферментативного расщепления.

1.2. Получение стабильно трансфицированных линий клеток

HEK293 (ATCC, № по кат. CRL-1573), при этом линии клеток, стабильно экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2 человека, конструировали следующим образом: плазмиды, кодирующие CLDN18.1 (GenScript, OHu29174D) или CLDN18.2

(GenScript, OHu03374D) человека, трансфицировали в клетки HEK293 с получением стабильных линий клеток, сверхэкспрессирующих CLDN18.1 или CLDN18.2 человека. Экспрессию CLDN18.1 и CLDN18.2 выявляли посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). В частности, 20000 трансфицированных клеток высевали в каждую лунку 96-луночного планшета с последующим добавлением коммерчески доступного антитела кролика к CLDN18 человека (LifeSpan Bio, LS-C168812-400). После 1 ч. инкубации при 4°C клетки промывали 2 раза с помощью PBS, а затем добавляли конъюгированное с AF-680 вторичное антитело козы к IgG кролика (Invitrogen, A21109). Через 1 ч. инкубации при 4°C клетки промывали 3 раза с помощью PBS, а затем осуществляли мониторинг интенсивности флуоресценции клеток с использованием прибора для FACS (IntelliCytique Plus BR).

1.3. Иммунизация мышей

Полностью гуманизированных трансгенных мышей (коммерчески доступных мышей Harbor HСAB 1.0, приобретенных у Harbor BioMed) иммунизировали вектором экспрессии CLDN18.2 человека и клетками HEK293, экспрессирующими CLDN18.2 (клетками HEK293/hCLDN18.2), полученными выше. "Пули" для генной пушки получали с использованием вектора экспрессии CLDN18.2 человека и золота в виде порошка. Мышей иммунизировали в нескольких участках брюшной полости с использованием генной пушки. Мышей иммунизировали с помощью ДНК вектора экспрессии (50 мкг каждый раз) с 2-недельными интервалами. Затем после трех иммунизаций мышей иммунизировали клетками HEK293/hCLDN18.2 с 2-недельными интервалами с использованием 4×10^6 клеток на мышь для каждой иммунизации. После двух иммунизаций кровь собирали для измерения титра. Сыворотку крови мышей анализировали в отношении аффинности связывания посредством FACS с использованием клеток CHOK1, экспрессирующих CLDN18.2 (kyinno, KC-1180). Мышей отбирали в соответствии с результатами измерения титра для скрининга моноклональных HСAB-антител. Мышей подвергали бустерной иммунизации за 3 дня до скрининга с помощью клеток HEK293/hCLDN18.2, 4×10^6 клеток на мышь, в качестве иммуногена.

Пример 2. Получение и скрининг однодоменных HСAB-антител к CLDN18.2

Отбирали мышей с высоким титром антител к CLDN18.2 в сыворотке крови, полученных в примере 1. Селезенки этих мышей собирали и выделяли В-клетки. Сортировали CD138-положительные (BD, 558626) клетки плазмы крови с использованием клеточного сортера BD FACS AriaIII, и CLDN18.2-положительные (CHOK1/hCLDN18.2, kyinno, KC-1180) популяции В-клеток обогащали с использованием магнитных микроносителей (Thermofisher, 11206D). РНК В-клеток экстрагировали и обратно транскрибировали в cDNA

(система синтеза SuperScript IV First-Strand synthesis system, Invitrogen, 18091200), и гены VH человека амплифицировали посредством ПЦР с использованием специфических праймеров. Праймеры для ПЦР:

5'-GGTGTCCAGTGTGTSAGGTGCAGCTG-3' (SEQ ID NO: 249)

5'-AATCCCTGGGCACTGAAGAGACGGTGACC-3' (SEQ ID NO: 250)

Амплифицированные фрагменты гена VH встраивали в векторы на основе плазмиды pCAG для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующие последовательность Fc-домена тяжелой цепи антитела подкласса IgG1 человека.

Сконструированные плазмиды трансфицировали в клетки-хозяева млекопитающих HEK293 (ATCC, CRL-1573) с получением экспрессированного HCAb-антитела в надосадочной жидкости. Первичный скрининг осуществляли посредством Mirgorball с использованием CHOК1/hCLDN18.2, экспрессирующих CLDN18.2 человека. Положительные клоны отбирали для вторичного скрининга. Вторичный скрининг осуществляли посредством FACS с использованием клеток HEK293/hCLDN18.1 и HEK293/hCLDN18.2.

Было получено 295 моноклональных антител, специфически связывающихся с CLDN18.2 человека, при этом нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены молекул антител, и соответствующие аминокислотные последовательности получали с использованием стандартных средств секвенирования. После удаления повторяющихся последовательностей получили 211 полностью человеческих моноклональных HCAb-антител к CLDN18.2, имеющих уникальные последовательности и специфически связывающихся с CLDN18.2 человека. В соответствии с результатом первичного скрининга и результатом вторичного скрининга для рекомбинантной экспрессии отобрали 54 антитела с высшим комплексным рейтингом. Очищенные моноклональные антитела дополнительно подвергали скринингу посредством проточной цитометрии в отношении способности связывания с опухолевыми клетками, эндогенно экспрессирующими CLDN18.2 человека, и 8 последовательностей антител с наивысшими показателями в комплексном рейтинге были отобраны в качестве молекул-кандидатов, как показано в таблице 3.

Специалистам в данной области техники хорошо известно, что в данной области техники CDR антитела могут быть определены с применением различных способов, таких как схема Kabat на основе переменности последовательностей (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, пятое издание, National Institutes of Health (U.S.), Бетесда, США, Мэриленд (1991)) и схема Chothia на основе расположения областей структурных петель (см. *J Mol Biol* 273: 927-48, 1997). В настоящей заявке комбинированная схема,

предусматривающая схему Kabat и схему Chothia, также может использоваться для определения аминокислотных остатков в последовательности варибельного домена. Комбинированная схема объединяет схему Kabat со схемой Chothia с получением большего диапазона, что подробно описано в таблице 1 в составе раздела "Сущность изобретения" настоящего изобретения. Анализ генов зародышевого типа и анализ сайта PTM, полученные после секвенирования из данного примера, показаны в таблице 2 ниже. Номера последовательностей антигенсвязывающих белков показаны в таблице 3 ниже.

Таблица 2. Анализ генов зародышевого типа и анализ сайта посттрансляционной модификации (PTM) последовательностей HCAb-антител

№	№ клона	Антитело	Ген V зародышевого типа VH	PTM VH
1	R1029P(CG20)001B02	PR004227	IGHV3-74*01	DG (HCDR2)
2	R1029P021E10	PR004533	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
3	R1029P028A11	PR004536	IGHV3-74*01	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
4	R1029P037B07	PR004540	IGHV3-74*01	DG (HCDR2), NXS/T (HCDR2)
5	R1029P021C02	PR004949	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
6	R1029P021F07	PR004950	IGHV3-74*01	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
7	R1029P021H07	PR004952	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
8	R1029P024B07	PR004953	IGHV3-30*03	DG (HCDR2)

Таблица 3. Номера последовательностей для HCAb-антител к CLDN18.2

Антитело	SEQ ID NO:				
	Тяжелая цепь	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR004227	182	150	16	42	77
PR004533	183	151	16	43	78
PR004536	184	152	16	44	79
PR004540	185	153	17	45	80

PR004949	186	154	18	43	80
PR004950	187	155	18	43	78
PR004952	188	156	16	43	81
PR004953	189	157	16	46	82

Пример 3. Удаление сайта посттрансляционной модификации HCAb-антител к CLDN18.2

Как PR004533, так и PR004536 имеют сайт изомеризации и сайт дезамидирования в области CDR2 тяжелой цепи. Для сайта посттрансляционной модификации в области CDR2 четыре аминокислоты NS и DG подвергли случайной мутации посредством ПЦР. Продукты ПЦР трансфицировали посредством электричества в *E. coli* для создания библиотеки случайных мутаций четырех сайтов аминокислот. Библиотеку мутантных вариантов подвергли скринингу посредством Mirroball с использованием клеток CHOК1/hCLDN18.1 и CHOК1/hCLDN18.2, и для секвенирования отбирали положительные молекулы, которые специфически связываются с CLDN18.2. Номера последовательностей для молекул показаны в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Часть номеров последовательностей для мутантных молекул PR004533 и PR004536.

Антитело	Тяжелая цепь	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Мутантный клон
PR007242	191	159	16	48	78	4533_M10E1
PR007243	192	160	16	49	78	4533_M3D9
PR007244	193	161	16	50	78	4533_M4H6
PR007245	194	162	16	51	78	4533_M6E6
PR007246	195	163	16	52	78	4533_M3F10
PR007247	196	164	16	53	79	4536_M8A6
PR007248	197	165	16	54	78	4533_M10E7

Пример 4. Получение и определение характеристик полноразмерных однодоменных HCAb-антител к CLDN18.2

4.1. Получение рекомбинантных однодоменных HCAb-антител

После получения последовательности переменного домена тяжелой цепи, кодирующей молекулы однодоменных HCAb-антител, последовательность переменного домена тяжелой цепи может быть слита с соответствующей последовательностью константного домена тяжелой цепи антитела человека и экспрессирована с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК с получением рекомбинантных молекул однодоменных HCAb-антител. В данном примере методами генной инженерии синтезировали

последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) антитела и клонировали ее в плазмидный вектор для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующий последовательность константного домена тяжелой цепи антитела подкласса IgG1 человека, таким образом, чтобы в нем кодировалась полноразмерная последовательность, обеспечивающая продуцирование однодоменного HCAb-антитела. В данном примере последовательности переменных доменов молекул моноклональных антител, полученных из иммунизированных мышей Harbor HCAb, представляли собой последовательности антител человека, поэтому в данном примере также получали полностью человеческое рекомбинантное HCAb-антитело к CLDN18.2.

Плазмиды, кодирующие рекомбинантные однодоменные HCAb-антитела, трансфицировали в клетки-хозяева млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO)), и при этом соответствующее очищенное рекомбинантное антитело может быть получено с применением стандартных методик экспрессии и очистки рекомбинантных белков. В частности, клетки ExpiCHO-S™ (Gibco, A29127) размножали в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Gibco, A2910001). Перед временной трансфекцией клетки регулировали до концентрации от 3×10^6 до 4×10^6 клеток/мл и культивировали на встряхивателе с 8% CO₂ при 37°C в течение 24 ч., что приводило к достижению концентрации клеток от 7×10^6 до 10×10^6 клеток/мл. Затем клетки разбавляли до 6×10^6 клеток/мл и получали 10 мл культивируемых клеток. 8 мкг вышеуказанных плазмид, кодирующих однодоменные HCAb-антитела (соотношение плазмид и клеток составляет 0,8 мкг : 1 мл), растворяли в 0,4 мл среды OptiPRO™ SFM (Gibco, 12309019). Полученную смесь фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм для стерилизации. Затем добавляли 32 мкл реагента для CHO Fectamine™ (Gibco, A29129) к 0,37 мл среды OptiPRO™ SFM (Gibco, 12309019). Раствор реагента для CHO ExpiFectamine™ сразу же медленно добавляли к раствору плазмид. Смесь переворачивали для обеспечения хорошего перемешивания. Смешанный раствор плазмид и реагента для трансфекции медленно добавляли по каплям при встряхивании колбы. Клетки культивировали на встряхивателе с 8% CO₂ при 37°C в течение 8–9 дней. Жизнеспособность клеток определяли через 8 дней.

Культуру собирали и центрифугировали при 3300 g в течение 10 мин., затем собирали надосадочную жидкость и центрифугировали при высокой скорости для удаления примесей. Гравитационную колонку (Bio-Rad, № 7311550), содержащую MabSelect™ (GE Healthcare Life Science, 71-5020-91 AE), уравнивали с помощью PBS (pH 7,4) и промывали с помощью PBS в количестве 2–5 объемов колонки. Образец надосадочной жидкости загружали в колонку. Колонку промывали с помощью PBS в количестве 5–10 объемов колонки. Целевой белок элюировали с помощью 0,1 М глицина (pH 3,5). Элюат

регулировали до нейтральности с помощью Tris-HCl (pH 8,0), и концентрировали, и осуществляли замену буфера на буфер на основе PBS с помощью пробирки для ультрафильтрации (Millipore, UFC901024) с получением раствора очищенного антитела. Затем раствор очищенного антитела подвергали определению концентрации с использованием NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One), расфасовывали по отдельным емкостям и хранили для последующего использования.

4.2. Определение характеристик антител посредством SEC-HPLC, HIC-HPLC и DSF

Необходимое количество вышеописанного очищенного образца загружали в аналитическую колонку для SEC TSKgel G3000SWxl (модель системы HPLC: Agilent 1260 Infinity II) для измерения чистоты. В данном способе использовались следующие параметры и условия: подвижная фаза 1 × PBS, pH 7,4 (Sangon, E607016); комнатная температура; скорость потока 1,0 мл/мин.; концентрация образца 1 мг/мл; объем инъекции 20 мкл; длина волны выявления 280 нм. После регистрации хроматограмму интегрировали с использованием программного обеспечения ChemStation и рассчитывали соответствующие данные. Генерировали отчет по анализу, в котором указаны значения времени удерживания для различных компонентов в образце.

Необходимое количество вышеописанного очищенного образца загружали в колонку для аналитической HIC TSKgel Butyl-NPR 4,6*35 (модель системы HPLC: Agilent 1260 Infinity II) для измерения чистоты и гидрофобности. Способ предусматривал линейный градиент от 100% подвижной фазы А (20 mM PB, 1,8 M (NH₄)₂SO₄, pH 6,0) до 100% подвижной фазы В (20 mM PB, pH 6,0) в течение 16 мин. Скорость потока устанавливали на 0,7 мл/мин., концентрация образца составляла 1 мг/мл, объем инъекции составлял 20 мкл, длина волны выявления составляла 280 нм. После регистрации хроматограмму интегрировали с использованием программного обеспечения ChemStation и рассчитывали соответствующие данные. Генерировали отчет по анализу, в котором указаны значения времени удерживания для различных компонентов в образце.

В данном примере температуру термической денатурации (T_m) белковой молекулы измеряли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). В 96-луночный планшет для ПЦР (Thermo, AB-0700/W) добавляли 10 мкг белка, затем добавляли 2 мкл 100-кратно разбавленного красителя SYPRO™ (Invitrogen, 2008138), а затем добавляли буфер с получением конечного объема 40 мкл на лунку. Планшет для ПЦР герметически закрывали, помещали в прибор для флуоресцентной количественной ПЦР в реальном времени (система для ПЦР Bio-Rad CFX96), инкубировали при 25°C в течение 5 мин., затем постепенно нагревали от 25°C до 95°C с градиентом 0,2°C/0,2 мин. и охлаждали до 25°C в конце теста. Применяли режим сканирования FRET и анализ данных

осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro для расчета T_m образца. Результаты вышеуказанного определения характеристик показаны в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Определение характеристик НСАВ-антител к CLDN18.2

Антитело	Чистота по SEC-HPLC (%)	Чистота по HIC-HPLC (%)	Время удерживания по HIC-HPLC (мин.)	T_m1 (°C)	T_m2 (°C)
PR004227	87,8	86,5	19,2	52,2	64,4
PR004533	99,2	100,0	17,2	NA	64,2
PR004536	97,6	100,0	17,1	52,8	66,0
PR004540	99,4	100,0	17,5	52,8	65,4
PR004949	99,2	100,0	16,0	59,0	NA
PR004950	98,7	100,0	16,2	NA	65,4
PR004952	100,0	100,0	15,8	61,2	NA
PR004953	98,2	100,0	18,9	60,0	NA
PR007242	94,3	100,0	15,7	56,6	65,4
PR007243	99,1	92,5	15,3	55,6	64,8
PR007244	99,1	94,3	15,3	59,6	NA
PR007245	98,9	94,5	15,2	59,8	NA
PR007246	99,1	93,9	15,2	59,0	64,6
PR007247	98,1	94,3	16,3	52,0	65,2
PR007248	99,3	100,0	15,4	60,6	NA
Трастузумаб	100,0	100,0	16,0	67,8	79,2

Пример 5. Аффинность связывания НСАВ-антител к CLDN18.2 с клетками

Аффинность связывания антитела определяли посредством FACS с использованием клеток HEK293, экспрессирующих CLDN18.1 человека, клеток HEK293, экспрессирующих CLDN18.2 человека, клеток NUGC4_D8 и клеток SNU601, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2 человека (Covioer, CBP60507). Субклонированные клетки NUGC4_D8 подвергали скринингу посредством лимитирующего разбавления с использованием клеток NUGC4 (JCRB, JCRB0834). Аффинность связывания определяли следующим образом: клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а затем ресуспендировали в буфере для FACS (PBS, содержащий 2% FBS). Плотность клеток регулировали до 10^6 клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток. Антитела разбавляли до различных концентраций буфером для FACS и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл разбавления антител. После 2 ч. инкубации при 4°C планшет

дважды промывали буфером для FACS. Затем добавляли буфер для FACS, содержащий конъюгированное с APC вторичное антитело козы к IgG человека (Jackson, 109-605-098). После 1 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в фиксирующем растворе, а затем осуществляли мониторинг флуоресценции клеток с использованием прибора для FACS (ACEA NovoCyte). PR000400, аналог IMAV362 (полученное внутрилабораторно, см. WO 2014/146672, имеющее такую же переменную область, как и IMAV362, отличающееся от IMAV362 только несколькими аминокислотами в константной области), использовали в качестве положительного контроля для связывания CLDN18.2. PR004549, аналог scFc CL-1xI2C (полученное внутрилабораторно, см. WO2020025792A1, имеющее такую же переменную область, как и scFc CL-1xI2C, отличающееся от scFc CL-1xI2C только несколькими аминокислотами в константной области), использовали в качестве положительного контроля для связывания CLDN18.2. Антитело PR002725 использовали в качестве положительного контроля для связывания CLDN18.1. См. CN2020/118650 (таблица 6, таблица 7 и таблица 8). Антитело Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) использовали в качестве отрицательного контроля.

На фиг. 1 (a–b), в таблице 9 и таблице 10 показана аффинность связывания антител в отношении клеток NUGC4_D8, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2. Тестируемые антитела были способны связываться с клетками NUGC4_D8 дозозависимым образом. Результаты показывают, что антитела PR004533, PR004949, PR004950, PR004952, PR004953, PR007242, PR007243, PR007244, PR007245, PR007246 и PR007248 проявляют более высокую аффинность в отношении клеток NUGC4_D8, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2, по сравнению с PR000400. На фиг. 1c и в таблице 11 показана аффинность связывания антител в отношении клеток SNU601, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2. Тестируемые антитела были способны связываться с клетками SNU601 дозозависимым образом. Результаты показывают, что антитела PR004227, PR004533, PR004536, PR004540, PR004949, PR004950 и PR004952 проявляют более высокую аффинность в отношении клеток SNU601, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2, по сравнению с PR000400. На фиг. 1d и в таблице 12 показана аффинность связывания антител в отношении клеток HEK293, сверхэкспрессирующих CLDN18.2 (HEK293/hCLDN18.2) человека. На фиг. 1 (e–f) показана аффинность связывания антител в отношении клеток HEK293, сверхэкспрессирующих CLDN18.1 (HEK293/hCLDN18.1) человека. Тестируемые антитела характеризуются низкой аффинностью связывания в отношении клеток HEK293/hCLDN18.1. Из представленных выше результатов можно сделать вывод, что тестируемые антитела связываются с белком CLDN18.2 человека в ECL1 (внеклеточная петля 1), а не в ECL2.

Таблица 6. Описание эталонных молекул антител

Антитело	Мишень	Описание
PR000400	CLDN18.2	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CLDN18.2 с последовательностью из патента WO2014/146672.
PR001861	CLDN18.1	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CLDN18.1, полученное внутрилабораторно компанией Harbour BioMed.
PR002725	CLDN18.1	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CLDN18.1 с последовательностью из патента PCT/CN2020/118650.
PR002726	CLDN18.2	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CLDN18.2 с последовательностью из патента PCT/CN2020/118650.
PR000325	Лизоцим курицы	В качестве изотипического контроля использовали моноклональное антитело подкласса IgG1, нацеливающееся на лизоцим курицы.
PR001848	CD3	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CD3 с последовательностью из патента PCT/CN2020/118606.
PR003886	CD3	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CD3 с последовательностью из патента PCT/CN2020/118606.
PR005080	CLDN2	Моноклональное антитело подкласса IgG1 к CLDN2 с последовательностью из патента EP3567053A1.
PR003767	TRBC1	В качестве контроля в экспериментах с ADCC использовали моноклональное антитело подкласса IgG1 к TRBC1.
PR004549	CLDN18.2/CD3	Биспецифическое антитело к CLDN18.2xCD3 с последовательностью из патента WO2020025792A1.
PR004931	CEA/CD3	Биспецифическое антитело к CEAxCD3 с последовательностью из патента WO2017055389A1.
PR002199	BCMA/CD3	Биспецифическое антитело к BCMAxCD3 с последовательностью из патента WO2018052503.
PR004312	Лизоцим курицы/CD3	Биспецифическое антитело, нацеливающееся на лизоцим и CD3, сконструированное с использованием последовательностей PR000325 и PR001848.
PR004313	CLDN18.1/CD3	Биспецифическое антитело, нацеливающееся на CLDN18.1 и CD3, сконструированное с использованием последовательностей PR001861 и PR001848.

Таблица 7. Номера последовательностей эталонных антител (моноклональных антител)

Антител о	Легка я цепь	Тяжела я цепь	VL	VH	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
PR00040 0	199	175	167	143	100	115	130	10	37	71
PR00186 1	201	177	169	145	102	117	132	12	39	73
PR00272 5	202	178	170	146	103	117	132	13	39	74
PR00272 6	203	179	171	147	104	118	133	14	40	75
PR00032 5	198	174	166	142	99	114	129	9	36	70
PR00184 8	200	176	168	144	101	116	131	11	38	72
PR00388 6	200	181	168	149	101	116	131	11	38	72
PR00508 0	205	190	173	158	106	120	135	19	47	83
PR00376 7	204	180	172	148	105	119	134	15	41	76

Таблица 8. Номера последовательностей эталонных антител (биспецифических антител)

Антитело	SEQ ID NO:			
	Полипептидная цепь-1	Полипептидная цепь-2	Полипептидная цепь-3	Полипептидная цепь-4
PR004549	212			
PR004931	218	215	217	216
PR002199	206	207	208	
PR004312	210	209	200	
PR004313	211	209	200	

Таблица 9. Аффинность связывания антител к CLDN18.2 (с сайтами посттрансляционной модификации в CDR) в отношении клеток NUGC4_D8 (см. фиг. 1A)

Антитело	Титр EC₅₀ (нМ)	Эффективность E_{max} (MFI)
PR000400	17,0	100,612
PR004227	NA	NA
PR004533	25,0	183,235
PR004536	NA	NA
PR004540	NA	NA
PR004949	21,8	265,481
PR004950	16,1	206,071
PR004952	41,0	239,521
PR004953	12,0	218,991
PR004549	NA	NA

Таблица 10. Аффинность связывания мутантных антител PR004533 и PR004536 в отношении клеток NUGC4_D8 (см. фиг. 1b)

Антитело	Титр EC₅₀ (нМ)	Эффективность E_{max} (MFI)
PR000400	56,4	58,383
PR007242	69,5	176,098
PR007243	78,2	176,068
PR007244	49,2	152,567
PR007245	63,2	136,796
PR007246	55,9	165,611
PR007247	NA	NA
PR007248	74,6	174,113

Таблица 11. Аффинность связывания антител к CLDN18.2 в отношении клеток SNU601

Антитело	Титр EC₅₀ (нМ)	Эффективность E_{max} (MFI)
PR000400	NA	NA
PR004227	28,5	14,849
PR004533	11,9	11,308
PR004536	52,7	15,799

PR004540	NA	NA
PR004949	12,8	18,260
PR004950	14,6	13,574
PR004952	16,4	12,179
PR004953	NA	NA
PR004549	NA	NA

Таблица 12. Аффинность связывания антител к CLDN18.2 в отношении клеток HEK293/hCLDN18.2

Антитело	Титр EC ₅₀ (нМ)	Эффективность E _{max} (MFI)
PR000400	5,60	1,319,493
PR007242	11,3	1,478,230
PR007243	13,3	1,467,203
PR007244	11,7	1,301,214
PR007245	13,0	1,307,122
PR007246	14,4	1,374,904
PR007247	35,3	1,272,613
PR007248	12,8	1,313,402

Пример 6. Конкургентная активность связывания HCAb-антител к CLDN18.2

Данный пример предназначен для исследования связывания моноклональных HCAb-антител к CLDN18.2 человека с эпитопной областью антигена CLDN18.2 человека. Эксперименты по конкурентному связыванию осуществляли на клеточном уровне с использованием клеток HEK293/hCLDN18.2, сверхэкспрессирующих CLDN18.2 человека. Вкратце, антитела к CLDN18.2 человека, PR000400 и PR004549, биотинилировали с использованием набора для биотинилирования (ThermoFisher, A35358) в соответствии с инструкциями. По 50 мкл каждого из биотинилированных антител к CLDN18.2 человека, PR000400 или PR004549, хорошо смешивали с 50 мкл соответствующего серийно разбавленного небитинилированного антитела к CLDN18.2 человека в 96-луночном планшете с V-образным дном (Corning, 3894). Затем суспензию клеток HEK293/hCLDN18.2, сверхэкспрессирующих CLDN18.2 человека, регулировали до 3×10^6 клеток/мл, высевали в количестве 50 мкл/лунка. Клетки инкубировали при 4°C в течение 2 ч. Клетки в каждой лунке промывали дважды с помощью 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS (2% FBS в PBS) и центрифугировали при 500 g, при 4°C в течение 5 мин., а затем надосадочную жидкость удаляли. После двукратной промывки добавляли флуоресцентное вторичное антитело (BD, 554060, конечная концентрация

1 мкг/мл) и инкубировали в темноте при 4°C в течение 1 ч. Клетки в каждой лунке промывали дважды с помощью 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS (2% FBS в PBS) и центрифугировали при 500 g, при 4°C в течение 5 мин., а затем надосадочную жидкость удаляли. Наконец, клетки в каждой лунке ресуспендировали в 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS и считывали значения сигнала флуоресценции с использованием BD FACS CANTOII. Степень ингибирования рассчитывали с использованием следующей формулы: степень ингибирования (%) = $(A - B)/A \times 100$ (примечание: A – сигнал флуоресценции после взаимодействия биотинилированного антитела с ISO hIgG1 (Crownbio, C0001-4); B – сигнал флуоресценции после взаимодействия биотинилированного антитела с небитинилированным антителом).

Как показано на фиг. 2 (a–b) и в таблице 13, все HCAb-антитела к CLDN18.2 по настоящему изобретению способны блокировать связывание PR000400 или PR004549 с CLDN18.2 человека, и выявленная блокирующая способность антител повышается с увеличением концентрации антител положительно коррелирующим образом; степень ингибирования может достигать > 80%, что указывает на то, что тестируемое HCAb имеет эпитопы, очень похожие на эпитопы для PR000400 и PR004549. Тестируемые антитела характеризуются низкой аффинностью связывания в отношении клеток HEK293/hCLDN18.1. Из представленных выше результатов можно сделать вывод, что тестируемые антитела связываются с белком CLDN18.2 человека в ECL1 (внеклеточная петля 1), а не в ECL2.

Таблица 13. Способность к конкурентному связыванию антител к CLDN18.2 в присутствии PR000400 и PR004549

Антитело	10 нМ биотинилированного PR000400		200 нМ биотинилированного PR004549	
	IC50 (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)	IC50 (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)
PR004533	25,5	98,6	23,2	93,7
PR004536	103	98,0	74,1	90,1
PR004540	64,1	95,8	50,0	89,2
PR004227	22,3	98,3	20,3	93,8
PR004949	35,4	98,5	31,0	94,2
PR004950	23,5	98,5	19,9	94,3

PR004952	30,1	98,5	27,8	93,3
PR004953	16,7	98,0	13,8	93,2
PR000400	20,1	96,4	11,5	90,7
PR004549	946	76,5	379	58,4
Iso hIgG1	NA	0,00	NA	0,00

Пример 7. Эндоцитарная активность HCAb-антител к CLDN18.2

Антитела анализировали в отношении их способности индуцировать цитотоксическое уничтожение клеток NUGC4_D8 при совместном культивировании с MMAF-конъюгированным антителом к IgG человека (Moradec, № по кат.: AH-102-AF) с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, G7573). Клетки NUGC4_D8 центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. и затем ресуспендировали в культуральной среде (RPMI1640 + 10% FBS) для регулирования плотности клеток до 2×10^4 клеток/мл. В каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток. Клетки инкубировали при 37°C в течение ночи. Антитела разбавляли средой до различных концентраций и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 25 мкл разбавления антител. Конъюгированное с MMAF антитело к IgG человека разбавляли средой и 25 мкл разбавления антитела добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета до конечной концентрации 6,6 нМ. Клетки инкубировали с антителом при 37°C в течение 3 дней. Обеспечивали отстаивание 96-луночного планшета при комнатной температуре в течение 30 мин. и в каждую лунку добавляли по 100 мкл хромогенного раствора CellTiter-Glo при комнатной температуре. Затем образец инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин. Планшет считывали с помощью PE Enspire. Жизнеспособность клеток (%) = [(люминесцентный образец)/(люминесцентный имитационный контроль)] × 100. PR000400 (аналог IMAB362) использовали в качестве положительного контроля, а антитело Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) – в качестве отрицательного контроля. На фиг. 3 (a–b) показана жизнеспособность клеток-мишеней. При совместном культивировании с MMAF-конъюгированным антителом к IgG человека тестируемые антитела проявляют лучший цитотоксический эффект в отношении клеток NUGC4_D8 дозозависимым образом по сравнению с PR000400.

Пример 8. Структура и разработка биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Отобранные антитела к CLDN18.2 и к CD3 использовали для получения биспецифического антитела. Полученное биспецифическое антитело к CLDN18.2×CD3 может связываться с двумя мишенями одновременно, при этом один конец способен распознавать CLDN18.2, специфически экспрессируемый на поверхности опухолевых клеток, а другой конец способен связываться с молекулами CD3 на Т-клетках. После

связывания с поверхностью опухолевых клеток молекула биспецифического антитела к CLDN18.2×CD3 может рекрутировать и активировать Т-клетки вокруг опухолевых клеток, уничтожая таким образом опухолевые клетки.

Как показано на фиг. 4, структура (1) представляет собой молекулу с асимметричной структурой Fab-Fc-двойная VH "2+1"; для молекулы с асимметричной структурой "2+1" структура включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и полипептидную цепь двойной VH антитела к CLDN18.2 соответственно; структуры (2) и (3) представляли собой молекулы с асимметричной структурой HCAb-Fc-Fab "2+1", которая включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и полипептидную цепь HCAb антитела к CLDN18.2 соответственно.

Структура (4) представляет собой молекулу с асимметричной структурой VH-VH_{HC}-Fab "4+1", которая включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и четырехвалентную полипептидную цепь VH антитела к CLDN18.2 соответственно.

Структура (5) представляет собой молекулу с асимметричной структурой VH-VH_{LC}-Fab "4+1", которая включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и четырехвалентную полипептидную цепь VH антитела к CLDN18.2 соответственно.

Структура (6) представляет собой молекулу с асимметричной структурой VH_{HC}-Fab-Fc-двойная VH "3+1", которая включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи антитела к CD3, с соответствующим N-концом, связанным с моновалентной VH антитела к CLDN18.2 и двухвалентной полипептидной цепью VH антитела к CLDN18.2 соответственно.

Структура (7) представляет собой молекулу с асимметричной структурой Fab-Fc-VH-VH-VH "3+1", которая включает три белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и трехвалентную полипептидную цепь VH антитела к CLDN18.2 соответственно.

Структура (8) представляет собой молекулу с асимметричной структурой Fab-Fc-scFv "1+1", которая включает две белковые цепи, содержащие тяжелую и легкую цепи соответствующего антитела к CD3 и полипептидную цепь scFv антитела к лизоциму или антитела к CLDN18.1 соответственно.

Для сведения к минимуму образования побочных продуктов с несовпадающими тяжелыми цепями (например, несовпадение двух тяжелых цепей антитела к CD3) использовали мутантную гетеродимерную Fc-область. Она несет мутацию "выступ-

"впадина" и модифицированную дисульфидную связь, как описано в WO2009080251 и WO2009080252. Биспецифическое антитело к CLDN18.2×CD3 имеет Fc из IgG1 и несет мутации L234A, L235A или L234A, L235A и G237A (пронумерованы в соответствии с индексом EU) в CH3 из Fc. Каждое биспецифическое антитело получали путем совместной трансфекции с помощью одновременно трех или четырех различных векторов для экспрессии у млекопитающих, кодирующих: 1) тяжелую цепь соответствующего антитела к CLDN18.2, которая несет мутацию "впадина" в Fc-области для получения гетеродимерного антитела, CH3 из Fc, несущую мутации L234A, L235A или L234A, L235A и G237A; 2) тяжелую цепь соответствующего антитела к CD3, которая несет мутацию "выступ" в Fc-области для получения гетеродимерного антитела, CH3 из Fc, несущую мутации L234A, L235A или L234A, L235A и G237A; и 3) легкую цепь соответствующего антитела к CD3. Мутация "выступ" в Fc-области IgG1 человека состоит из T366W, а мутация "впадина" состоит из T366S, L368A и Y407V. Кроме того, в Fc-область можно включать S354C "выступа" и Y349C "впадины"; они образуют пару дисульфидных связей для повышения стабильности и выхода гетеродимерного антитела.

Конкретная информация о биспецифических антителах к CLDN18.2×CD3, сконструированных в соответствии с настоящим изобретением, представлена в таблицах 14, 15 и 16.

Таблица 14. Биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3, сконструированные в соответствии со структурами (1)–(8) из данного примера

Структура	Молекула биспецифического антитела	Антитело к CD3	Антитело к CLDN18.2	CD3-концевая структура	CLDN18.2-концевая структура	Линкерный пептид	Тип Fc CD3-конца (мутация)	Тип Fc CLDN18.2-конца (мутация)
1	PR004603	PR003886	PR004227	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005072	PR003886	PR004533	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005076	PR003886	PR004536	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005354	PR001848	PR004533	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека	IgG1 человека

							(выступ, LALA)	(впадина, LALA)
1	PR005397	PR003886	PR007246	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005398	PR003886	PR007242	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005399	PR003886	PR007243	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005401	PR003886	PR007244	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005411	PR003886	PR007245	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR005422	PR003886	PR007247	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR006023	PR001848	PR007246	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
1	PR006292	PR003886	PR007245	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR006293	PR001848	PR007245	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR006384	PR003886	PR007246	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR007079	PR003886	PR007243	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека	IgG1 человека

							(выступ, AAA)	(впадина, AAA)
1	PR007080	PR003886	PR007244	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR007081	PR003886	PR007242	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR007082	PR003886	PR007248	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
1	PR007083	PR003886	PR007245	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, AAA)	IgG1 человека (впадина, AAA)
2	PR005518	PR001848	PR004533	Fab	VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
3	PR005519	PR001848	PR004533	Fab	VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
4	PR005520	PR001848	PR004533	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
5	PR005521	PR001848	PR004533	Fab	Двойная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
6	PR005522	PR001848	PR004533	Fab	Трехвале нтная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
7	PR005525	PR003886	PR004533	Fab	Трехвале нтная VH	GS_15	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)
8	PR004312	PR001848	PR000325	Fab	scFv	GS_20	IgG1 человека	IgG1 человека

							(выступ, LALA)	(впадина, LALA)
8	PR004313	PR001848	PR001861	Fab	scFv	GS_20	IgG1 человека (выступ, LALA)	IgG1 человека (впадина, LALA)

Таблица 15. Номера последовательностей биспецифического антитела к CLDN18.2×CD3 по настоящему изобретению

Антитело	SEQ ID NO:		
	Полипептидная цепь-1	Полипептидная цепь-2	Полипептидная цепь-3
PR004603	214	213	200
PR005072	219	213	200
PR005076	220	213	200
PR005397	221	213	200
PR005398	222	213	200
PR005399	223	213	200
PR005401	224	213	200
PR005411	225	213	200
PR005422	226	213	200
PR005518	227	228	200
PR005519	227	230	229
PR005520	219	231	200
PR005521	219	232	229
PR005522	219	233	200
PR005525	234	213	200
PR005354	219	209	200
PR006023	221	209	200
PR006292	236	235	200
PR006293	236	237	200
PR006384	238	235	200
PR007079	239	235	200
PR007080	240	235	200
PR007081	241	235	200
PR007082	242	235	200
PR007083	243	235	200

Таблица 16. Номера последовательностей CDR антигенсвязывающего домена биспецифического антитела к CLDN18.2×CD3 по настоящему изобретению

Номер структуры	Номер молекулы	Номер антигенсвязывающего домена	SEQ ID NO:					
			LCD R1	LCD R2	LCD R3	HCD R1	HCD R2	HCD R3
1	PR004603	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	42	77
1	PR005072	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
1	PR005076	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	44	79
1	PR005354	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
1	PR005397, PR006384	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	52	78
1	PR005398, PR007081	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	48	78
1	PR005399, PR007079	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	49	78
1	PR005401, PR007080	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	50	78
1	PR005411, PR006292, PR007083	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	51	78
1	PR005422	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	53	79
1	PR006023	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	52	78
1	PR006293	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	51	78
1	PR007082	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	54	78
2	PR005518	#1	101	116	131	11	38	72

		#2				16	43	78
3	PR005519	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
4	PR005520	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
5	PR005521	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
6	PR005522	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78
7	PR005525	#1	101	116	131	11	38	72
		#2				16	43	78

Пример 9. Получение и определение характеристик биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

9.1. Получение рекомбинантных биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Множество плазмид, кодирующих рекомбинантные биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3, трансфицировали в клетки-хозяева млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомячка (CHO)) в соответствии с определенной пропорцией, и при этом соответствующее очищенное рекомбинантное антитело может быть получено с применением стандартных методик экспрессии и очистки рекомбинантных белков. В частности, клетки ExpiCHO-S™ (Gibco, A29127) размножали в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Gibco, A2910001). Перед временной трансфекцией клетки регулировали до концентрации от 3×10^6 до 4×10^6 клеток/мл и культивировали на встряхивателе с 8% CO₂ при 37°C в течение 24 ч., что приводило к достижению концентрации клеток от 7×10^6 до 10×10^6 клеток/мл. Затем клетки разбавляли до 6×10^6 клеток/мл и получали 10 мл культивируемых клеток. Всего 8 мкг вышеуказанных плазмид, кодирующих биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 (соотношение плазмид и клеток составляет 0,8 мкг : 1 мл) растворяли в 0,4 мл среды OptiPRO™ SFM (Gibco, 12309019). Полученную смесь фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм для стерилизации. Затем добавляли 32 мкл реагента для CHO Fectamine™ (Gibco, A29129) к 0,37 мл среды OptiPRO™ SFM (Gibco, 12309019). Раствор реагента для CHO ExpiFectamine™ сразу же медленно добавляли к раствору плазмид. Смесь переворачивали для обеспечения хорошего перемешивания. Смешанный раствор плазмид и реагента для трансфекции медленно добавляли по каплям при встряхивании колбы. Клетки культивировали на встряхивателе с 8% CO₂ при 37°C в течение 8–9 дней. Жизнеспособность клеток определяли через 8 дней.

Культуру собирали и центрифугировали при 3300 г в течение 10 мин., затем собирали надосадочную жидкость и центрифугировали при высокой скорости для удаления примесей. Гравитационную колонку (Bio-Rad, 7311550), содержащую MabSelect™ (GE Healthcare Life Science, 71-5020-91 AE), уравнивали с помощью PBS (pH 7,4) и промывали с помощью PBS в количестве 2–5 объемов колонки. Образец надосадочной жидкости загружали в колонку. Колонку промывали с помощью PBS в количестве 5–10 объемов колонки. Целевой белок элюировали с помощью 0,1 М глицина (pH 3,5). Элюат регулировали до нейтральности с помощью Tris-HCl (pH 8,0), и концентрировали, и осуществляли замену буфера на буфер на основе PBS с помощью пробирки для ультрафильтрации (Millipore, UFC901024) с получением раствора очищенного антитела. Затем раствор очищенного антитела подвергали определению концентрации с использованием NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One), расфасовывали по отдельным емкостям и хранили для последующего использования.

9.2. Определение характеристик антител посредством SEC-HPLC, HIC-HPLC и DSF

Необходимое количество вышеописанного очищенного образца загружали в аналитическую колонку для SEC TSKgel G3000SWxl (модель системы HPLC: Agilent 1260 Infinity II) для измерения чистоты. В данном способе использовались следующие параметры и условия: подвижная фаза 1 × PBS, pH 7,4 (Sangon, E607016); комнатная температура; скорость потока 1,0 мл/мин.; концентрация образца 1 мг/мл; объем инъекции 20 мкл; длина волны выявления 280 нм. После регистрации хроматограмму интегрировали с использованием программного обеспечения ChemStation и рассчитывали соответствующие данные. Генерировали отчет по анализу, в котором указаны значения времени удерживания для различных компонентов в образце.

Необходимое количество вышеописанного очищенного образца загружали в колонку для аналитической HIC TSKgel Butyl-NPR 4,6*35 (модель системы HPLC: Agilent 1260 Infinity II) для измерения чистоты и гидрофобности. Способ предусматривал линейный градиент от 100% подвижной фазы А (20 mM PB, 1,8 M (NH₄)₂SO₄, pH 6,0) до 100% подвижной фазы В (20 mM PB, pH 6,0) в течение 16 мин. Скорость потока устанавливали на 0,7 мл/мин., концентрация образца составляла 1 мг/мл, объем инъекции составлял 20 мкл, длина волны выявления составляла 280 нм. После регистрации хроматограмму интегрировали с использованием программного обеспечения ChemStation и рассчитывали соответствующие данные. Генерировали отчет по анализу, в котором указаны значения времени удерживания для различных компонентов в образце.

В данном примере температуру термической денатурации (T_m) белковой молекулы измеряли посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). В 96-

луночный планшет для ПЦР (Thermo, AB-0700/W) добавляли 10 мкг белка, затем добавляли 2 мкл 100-кратно разбавленного красителя SYPRO™ (Invitrogen, 2008138), а затем добавляли буфер с получением конечного объема 40 мкл на лунку. Планшет для ПЦР герметически закрывали, помещали в прибор для флуоресцентной количественной ПЦР в реальном времени (система для ПЦР Bio-Rad CFX96), инкубировали при 25°C в течение 5 мин., затем постепенно нагревали от 25°C до 95°C с градиентом 0,2°C/0,2 мин. и охлаждали до 25°C в конце теста. Применяли режим сканирования FRET и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Maestro для расчета T_m образца. Результаты вышеуказанного определения характеристик показаны в таблице 17 ниже.

Таблица 17. Определение характеристик биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Антитело	Чистота по SEC-HPLC (%)	Чистота по HIC-HPLC (%)	Время удерживания по HIC-HPLC (мин.)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
PR004549	93,4	100,0	19,0	56,0	NA
PR004603	100,0	100,0	19,2	50,0	66,8
PR005072	99,1	100,0	16,4	59,0	64,2
PR005076	97,8	92,1	18,3	50,2	66,8
PR005397	100,0	100,0	16,2	52,0	59,0
PR005398	98,9	100,0	16,7	54,2	67,8
PR005399	86,0	100,0	16,5	53,8	67,8
PR005401	99,6	100,0	16,1	60,0	67,4
PR005411	100,0	100,0	16,2	60,2	67,4
PR005422	99,7	100,0	18,0	48,4	66,4
PR005518	64,0	100,0	16,0	53,4	64,4
PR005519	68,9	100,0	15,9	53,4	64,2
PR005520	89,7	100,0	16,4	54,0	62,8
PR005521	89,0	100,0	16,3	54,8	62,6
PR005522	100,0	100,0	16,5	52,0	63,8
PR005525	99,7	100,0	16,4	63,2	66,4
PR005354	99,8				
PR006023	100,0	100,0	16,0	59,2	65,8
PR006292	99,4	100,0	15,9	59,6	66,8

PR006293	99,0	100,0	16,0	59,8	65,8
PR006384	100,0	100,0	15,9	59,2	67,0
PR007079	99,4	100,0	16,1	55,6	66,4
PR007080	97,8	100,0	16,0	59,6	66,8
PR007081	95,8	100,0	16,2	56,2	66,6
PR007082	98,5	86,10	16,1	60,8	66,8
PR007083	84,5	100,0	16,1	51,8	67,6
Трастузумаб	100,0	100,0	16,0	67,8	79,2

Пример 10. Аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток

Антитела анализировали посредством FACS в отношении аффинности связывания. Тестируемые клетки включают клетки HEK293/hCLDN18.2, HEK293/hCLDN18.1, NUGC4_D8 и Jurkat. Аффинность связывания определяли следующим образом: клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а затем ресуспендировали в буфере для FACS (PBS, содержащий 2% FBS). Плотность клеток регулировали до 10^6 клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток. Антитела разбавляли до различных концентраций буфером для FACS и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл разбавления антител. После 2 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Затем добавляли буфер для FACS, содержащий конъюгированное с APC вторичное антитело козы к IgG человека (конечная концентрация 1,5 мкг/мл, Jackson, 109-605-098). После 1 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в фиксирующем растворе, а затем осуществляли мониторинг флуоресценции клеток с использованием прибора для FACS (ACEA NovoCyte). На фиг. 5 и в таблице 18 показана аффинность связывания антител в отношении клеток. Все тестируемые антитела могут связываться с клетками, экспрессирующими CLDN18.2 и CD3, и не связываются с клетками, экспрессирующими CLDN18.1.

Таблица 18. Аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток

Антитело	Титр EC ₅₀ (нМ)		
	NUGC4_D8	HEK293/hCLDN1 8.2	Jurkat
PR004549	NA	50,4	3,6
PR004603	NA	33,1	NA

PR005072	90,7	15,7	NA
PR005076	NA	NA	NA
PR005397	27,5	12,8	NA
PR005398	19,4	20,4	NA
PR005399	NA	25,3	81,9
PR005401	13,1	17,5	NA
PR005411	20,5	16,0	85,9
PR005422	NA	NA	NA
PR005518	20,5		NA
PR005519	13,9		NA
PR005520	13,9		NA
PR005521	13,9		NA
PR005522	13,9		NA
PR005525	12,6		26,8
PR005354	12,6		NA
PR006023	31,3		40,6
PR006292	70,1	11,5	NA
PR006293	78,0		65,0
PR006384	51,4	14,4	NA
PR007079	73,2	NA	NA
PR007080	46,7	NA	NA
PR007081	49,3	NA	NA
PR007082	44,2	NA	41,0
PR007083	NA	9,6	NA

Примечание: пробелы в таблице указывают на то, что молекулу не подвергали анализу аффинности в отношении клеток HEK293/hCLDN18.2; NA указывает на то, что значение EC₅₀ для данной молекулы не удалось получить путем аппроксимации в анализе аффинности в отношении клеток HEK293/hCLDN18.2.

Пример 11. Активность в виде TDCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 анализировали на эффективность TDCC в отношении клеток NUGC4_D4, SNU620, IM95 и HEK293/hCLDN 18.1 с использованием набора для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, G1780). Т-клетки выделяли из РВМС человека с использованием набора для выделения совокупности Т-клеток человека (Miltenyi, 130-096-535). Т-клетки человека и клетки-мишени

ресуспендировали в среде (RPMI1640 + 5% FBS). Плотность клеток-мишеней регулировали до 3×10^5 клеток/мл, а плотность Т-клеток регулировали до $1,2 \times 10^6$ /мл. Добавляли по 50 мкл каждого типа клеток в лунки 96-луночного планшета (соотношение эффектора и мишени составляло 4:1). Тестируемое антитело разбавляли средой (RPMI1640+5% FBS) до различных концентраций и добавляли по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета. Образцы инкубировали при 37°C в течение 48 ч., а затем для получения лизата добавляли $10 \times$ Triton-X 100 (RPMI1640 + 5% FBS + 10% Triton-X 100) в контрольную лунку с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями и контрольную лунку для коррекции объема. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 0,5 ч. 96-луночный планшет центрифугировали при 400 g в течение 4 мин. Отбирали 50 мкл надосадочной жидкости, а затем добавляли хромогенный раствор LDH в концентрации 50 мкл/лунка. После отстаивания смеси в отсутствие светового излучения при комнатной температуре в течение 20 мин. планшет считывали на приборе MD StakMax (OD₄₉₀). PR004549 использовали в качестве положительного контроля для клеток-мишеней CLDN18.2, PR004313 – в качестве положительного контроля для клеток-мишеней CLDN18.1, а антитело PR004312 – в качестве отрицательного контроля. Для расчета результатов сначала рассчитывались скорректированные показания. Показание контрольной лунки для учета обеспечиваемого средой фона вычитали из показаний экспериментальных лунок, контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями и контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками, а затем показание контрольной лунки для коррекции объема вычитали из показания контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями. Активность в виде TDCC (%) = (скорректированное показание экспериментальной лунки - скорректированное показание контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками - контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями)/(скорректированное показание контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями - контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями) \times 100. На фиг. 6 показана активность в виде TDCC тестируемых антител, а значения подробно описаны в таблице 19. В клетках NUGC4_D8, эндогенно экспрессирующих CLDN18.2 на высоком уровне, тестируемые антитела могут индуцировать активность в виде TDCC, которая является более высокой по сравнению с таковой в случае PR004549 или сопоставимой с ней. В свою очередь в клетках IM95, экспрессирующих CLDN18.2 на низком уровне, тестируемые антитела индуцируют активность в виде TDCC, которая является более низкой по сравнению с таковой в случае PR004549. Клетки SNU620 имеют мутацию,

обеспечивающую замену метионина на лейцин в аминокислоте 149 CLDN18.2, репрезентируя подгруппу пациентов с раком желудка с мутацией CLDN18.2, и при этом тестируемые антитела могут индуцировать в них активность в виде TDCC, которая является более высокой по сравнению с таковой в случае PR004549 или сравнимой с ней. Посредством тестируемых антител не удалось вызвать эффект в виде TDCC в отношении клеток HEK293/hCLDN 18.1.

Таблица 19. Активность в виде TDCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Антитело	Титр EC ₅₀ (нМ)		
	NUGC4_D8	IM95	SNU620
PR004549	32,0-502	109-159	55,9-66,2
PR004603	251	NA	17,8
PR005072	142	NA	34,5
PR005076	102		
PR005397	10,0	NA	31,6
PR005398	9,00	NA	18,3
PR005399	14,8		41,1
PR005401	6,40		25,8
PR005411	11,0	NA	38,5
PR005422	21,9	NA	313,0
PR005518	30,6		
PR005519	32,9	NA	70,5
PR005520	22,4		
PR005521	73,9	NA	41,0
PR005522	186		
PR005525	28,9		
PR005354	11,0		
PR006023	48,5		
PR006292	185	NA	112,7
PR006293	87,0	460	18,5
PR006384	57,9	938	57,1

Пример 12. Аффинность связывания антител с белками Fc-рецептора человека, оцененная с помощью способа на основе BLI

Кинетику связывания белков и антител анализировали посредством методики биослойной интерферометрии (BLI) с использованием системы Octet Red 96e (Fortebio).

Скорость вращения системы устанавливали на уровне 1000 об./мин. 10× буфер для кинетического анализа (ForteBio, № по кат. 18-1105) разбавляли до 1× буфера для кинетического анализа для анализа аффинности и разбавления образцов. Датчик FAB2G (ForteBio, 18-5125), входящий в состав оборудования, уравнивали в буфере для выполнения теста в течение 10 мин., а затем использовали для захвата антител (PR002725, PR005397, PR006384, PR005411, PR006292, PR006023 и PR006293) при высоте захвата 1 нм. После уравнивания в буфере в течение 120 с обеспечивали связывание сенсора FAB2G с 2-кратно серийно разбавленным белком Fc-рецептора человека. Концентрация белка и время связывания и диссоциации показаны в таблице 20. Наконец, датчик FAB2G погружали в 10 мМ раствор глицина-соляной кислоты при pH 1,5 для регенерации и элюирования белков, связанных с датчиком. Анализы аффинности антител к FcRn осуществляли в условиях как буфера с pH 6,0, так и буфера с pH 7,4. Для PR004549 датчиком захвата является ProL (ForteBio, 18-5085). Если анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis (ForteBio, версия 11.0), в качестве холостого контроля использовали 0 нМ и выполняли вычитание значения этого контроля; для аппроксимации данных выбирали способ "Глобальная аппроксимация 1:1" и рассчитывали параметры кинетики связывания белков с антителами с получением значений $k_{on}(1/Мс)$, значений $k_{dis}(1/с)$ и значений $KD(М)$. В случае взаимодействий, представляющих собой быстрое связывание и быструю диссоциацию, для аппроксимации данных выбирали способ "равновесного состояния" с получением значений $KD(М)$. Аффинность связывания антител с белками Fc-рецептора человека показана в таблице 21.

Таблица 20. Информация о белках Fc-рецептора и параметрах эксперимента

Белок Fc-рецептора	№ по каталогу	Изготовитель	Тестируемая концентрация (нМ)	Время связывания/время диссоциации
CD64 человека	CM60	NovoProtein Scientific Co., Ltd.	200-12,5*	60 с/20 с
FcRn человека	CI01		400-25 (pH 6,0) 1000-62,5 (pH 7,4)	60 с/20 с
CD32a человека	CS35		10000-625	30 с/20 с
CD32b человека	C444		10000-625	30 с/20 с
CD16a(F) человека	CS11		10000-625	60 с/20 с
CD16a(V) человека	C441		6000-375	60 с/20 с

*Для антитела PR002725 тестируемая концентрация CD64 составляла 40–1,25 нМ.

Таблица 21. Аффинность связывания антител с белками Fc-рецептора человека

Fc-рецептор	Антитело	Концентрация (нМ)	KD (М)	kon (1/М с)	kdis (1/с)	Полный R ²	
CD64 человека	PR002725	40-1,25	9,13E-11	1,42E+06	1,30E-04	0,9978	
	PR004549	200-25	9,62E-06	6,00E+04	5,77E-01	0,9814	
	PR005397	200-12,5	5,06E-08	8,66E+05	4,38E-02	0,9951	
	PR006384	800-50	NA ¹				
	PR005411	200-12,5	4,71E-08	8,85E+05	4,17E-02	0,9934	
	PR006292	800-50	NA ¹				
	PR006023	200-12,5	5,39E-08	8,74E+05	4,71E-02	0,9952	
	PR006293	800-50	NA ¹				
CD16a(V) человека	PR002725	400-25	1,29E-07	5,85E+05	7,57E-02	0,9944	
	PR004549	6000-375	NA ¹				
	PR005397	6000-375	1,80E-06	NA ²	NA ²	0,9218	
	PR006384	6000-375	NA ¹				
	PR005411	6000-375	2,30E-06	NA ²	NA ²	0,9126	
	PR006292	6000-375	NA ¹				
	PR006023	6000-375	3,00E-06	NA ²	NA ²	0,9002	
	PR006293	6000-375	NA ¹				
CD16a(F) человека	PR002725	10000-625	2,10E-06	NA ²	NA ²	0,9884	
	PR004549		NA ¹				
	PR005397		NA ¹				
	PR006384		NA ¹				
	PR005411		NA ¹				
	PR006292		NA ¹				
	PR006023		NA ¹				
	PR006293		NA ¹				
FcRn человека, рН 6,0	PR002725	400-25	1,55E-07	3,46E+05	5,37E-02	0,9906	
	PR004549	400-25	2,06E-07	2,80E+05	5,77E-01	0,9852	
	PR005397	400-25	1,82E-07	3,22E+05	5,86E-02	0,9907	
	PR006384	400-25	2,10E-07	2,89E+05	6,08E-02	0,9898	
	PR005411	400-25	2,15E-07	3,00E+05	6,44E-02	0,9879	
	PR006292	400-25	2,00E-07	3,05E+05	6,09E-02	0,9895	

	PR006023	400-25	2,10E-07	2,98E+05	6,26E-02	0,9889
	PR006293	400-25	2,17E-07	2,91E+05	6,32E-02	0,9886
FcRn человека, pH 7,4	PR002725	1000-62,5	NA ¹			
	PR004549					
	PR005397					
	PR006384					
	PR005411					
	PR006292					
	PR006023					
	PR006293					
CD32a(H) человека	PR002725	10000-625	7,40E-07	NA ²	NA ²	0,9828
	PR004549		NA ¹			
	PR005397					
	PR006384					
	PR005411					
	PR006292					
	PR006023					
	PR006293					
CD32b человека	PR002725	10000-625	2,60E-06	NA ²	NA ²	0,9981
	PR004549		NA ¹			
	PR005397					
	PR006384					
	PR005411					
	PR006292					
	PR006023					
	PR006293					

NA¹: отсутствие связывания антитела с белком

NA²: антитело связывается с рецепторным белком в режиме быстрого связывания и быстрой диссоциации; выбранный способ аппроксимации представляет собой аппроксимацию для равновесного состояния без значений kon/kdis.

Пример 13. Аффинность связывания антител с белками CD3 различных видов, оцененная с помощью способа на основе BLI

Кинетику связывания белков и антител анализировали посредством методики биослойной интерферометрии (BLI) с использованием системы Octet Red 96e (ForteBio). CD3E человека (Acro, CDE-H5223), CD3E яванского макака (Acro, CDE-C5226) и CD3E мыши (Acro, CDE-M5256) смешивали с биотином (Thermo Scientific, A39257) в молярном соотношении 1:3. Смесь инкубировали при 4°C в течение ночи, а затем удаляли избыток биотина с получением биотинилированного CD3E. Скорость вращения системы устанавливали на уровне 1000 об./мин. 10× буфер для кинетического анализа (ForteBio, № по кат. 18-1105) разбавляли до 1× буфера для кинетического анализа для анализа аффинности и разбавления образцов. Сенсор SA (ForteBio, 18-5019), входящий в состав оборудования, уравнивали в буфере для выполнения теста в течение 10 мин., а затем использовали для захвата CD3 с биотиновой меткой или биотинилированного CD3 при высоте захвата 0,2 нм. После уравнивания в буфере в течение 120 с обеспечивали связывание сенсора SA с захваченным CD3 с 2-кратно серийно разбавленными антителами. Концентрация антител показана в таблице 22, а время связывания и диссоциации были установлены на уровне 180 с и 300 с. Наконец, сенсор SA погружали в 10 мМ раствор глицина-соляной кислоты при pH 1,5 для регенерации и элюирования антител, связанных с сенсором. Антитело к CD3e 48-2B (Santa Cruz Biotechnology, SC-1174) представляет собой антитело, положительное в отношении мыши. Если анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis (ForteBio, версия 11.0), в качестве холостого контроля использовали 0 нМ и выполняли вычитание значения этого контроля; для аппроксимации данных выбирали способ "Глобальная аппроксимация 1:1" и рассчитывали параметры кинетики связывания белков с антителами с получением значений $k_{on}(1/Мс)$, значений $k_{dis}(1/с)$ и значений $KD(М)$. В случае взаимодействий, представляющих собой быстрое связывание и быструю диссоциацию, для аппроксимации данных выбирали способ "равновесного состояния" с получением значений $KD(М)$. Аффинность связывания антител с белками CD3 различных видов показана в таблице 23. PR002199 получали из биспецифического антитела к BCMA(TNB308902)×CD3(TNB_F2B) согласно патенту WO2018052503 от Teneobio. PR004931 получали из биспецифического антитела к CEA×CD3, описанного в патенте WO2017055389A1 от Roche.

Таблица 22. Информация о рецепторных белках CD3 и параметрах эксперимента

Белок	№ по каталогу	Изготовитель
Биотинилированный CD3E&D человека	CDD-H82W6	Acro biosystems
CD3Ec человека	CDE-H5223	
Биотинилированный CD3E&D яванского макака	CDD-C82W6	
CD3E яванского макака	CDE-C5226	
Биотинилированный CD3E&D мыши	CDD-M82W5	

Таблица 23. Аффинность связывания антител с белками CD3 различных видов

Белок	Антитело	Концентрация (нМ)	KD (M)	kon (1/Мс)	kdis (1/с)	Полный R ²
CD3E человека	PR004549	20-1,25	4,10E-09	1,59E+05	6,52E-04	0,9986
	PR004931	100-6,25	3,08E-08	7,31E+04	2,25E-03	0,9992
	PR006292	100-6,25	9,90E-08	9,89E+04	9,78E-03	0,9971
	PR006293	100-6,25	3,17E-08	6,81E+04	2,16E-03	0,9993
	PR006384	100-6,25	1,51E-07	8,54E+04	1,29E-02	0,9981
Биотинилированный CD3E&D человека	PR002199	200-12,5	2,41E-07	2,15E+05	5,18E-02	0,9834
	PR004549	30-1,875	6,15E-09	9,65E+04	5,93E-04	0,9988
	PR004931	100-6,25	3,37E-08	4,07E+04	1,37E-03	0,9973
	PR006292	100-6,25	1,44E-07	8,47E+04	1,22E-02	0,9972
	PR006384	100-6,25	1,32E-07	9,02E+04	1,19E-02	0,9985

CD3E яванского макака	PR004549	20-1,25	9,75E-09	4,03E+04	3,93E-04	0,9998
	PR004931	100-6,25	2,59E-08	7,03E+04	1,82E-03	0,9995
	PR006292	100-6,25	1,40E-07	7,51E+04	1,05E-02	0,9952
	PR006293	100-6,25	3,24E-08	6,07E+04	1,97E-03	0,9995
	PR006384	100-6,25	1,65E-07	7,40E+04	1,22E-02	0,9970
Биотинилированный CD3E&D яванского макака	PR004549	30-1,875	1,30E-08	1,79E+04	2,33E-04	0,9995
	PR004931	100-6,25	2,13E-08	4,16E+04	8,83E-04	0,9972
	PR006292	100-6,25	1,13E-07	8,57E+04	9,65E-03	0,9991
	PR006384	100-6,25	1,52E-07	6,22E+04	9,42E-03	0,9986
Биотинилированный CD3E&D мыши	Антитело к CD3e (48-2B)	40-2,5	1,71E-10	8,03E+05	1,37E-04	0,9940
	PR004549	120-7,5	NA ¹			
	PR006384	120-7,5				
	PR006292	120-7,5				
	PR004931	120-7,5				

NA¹: отсутствие связывания антитела с белком

Пример 14. Аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 с паралогичными белками CLDN18.2 человека

Антитела анализировали в отношении аффинности связывания с паралогичными белками CLDN18.2 человека посредством FACS (ACEA NovoCyte). Гены CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9 паралогичного семейства CLDN18.2 человека временно трансфицировали в клетки HEK293. Информация о плаزمиде представлена в таблице 24. Аффинность связывания определяли следующим образом: клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а затем ресуспендировали в буфере для FACS (PBS, содержащий 2% FBS). Плотность клеток регулировали до 10⁶ клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного

планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток. Антитело разбавляли до 60 нМ буфером для FACS и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл разбавления антител. После 2 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Затем добавляли буфер для FACS, содержащий вторичное антитело. После 1 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в фиксирующем растворе и проводили анализ FACS. Информация об антителе положительного контроля, антителе отрицательного контроля и вторичном антителе представлена в таблице 25. PR005080 представляло собой клон антитела 1A2 (полученный внутрилабораторно, см. EP3567053A1), используемый в качестве положительного контроля для связывания CLDN2. Результаты FACS показаны на фиг. 7, где продемонстрировано отсутствие неспецифического связывания PR006384 и PR006292 с белком паралогичного семейства CLDN18.2 человека CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9.

Таблица 24. Информация о плаزمидах для экспрессии паралогичных генов CLDN18.2

Название	Поставщик	№ по каталогу
pcDNA3.1_hCLDN9_NM_020982	GenScript	NM_020982.4
pcDNA3.1_hCLDN6_NM_021195	GenScript	NM_021195.5
pcDNA3.1_hCLDN4_NM_001305	GenScript	NM_001305.4
pcDNA3.1_hCLDN3_NM_001306	GenScript	NM_001306.4
pcDNA3.1_hCLDN2_NM_001171092	GenScript	NM_001171092.1
pcDNA3.1_hCLDN1_NM_021101	GenScript	NM_021101.5

Таблица 25. Информация об антителах для проточной цитометрии

Название	Поставщик	№ по каталогу
Антитело к клаудину-1 человека	R&D	MAB4618
Антитело к клаудину-3 человека	R&D	MAB4620
Антитело к клаудину-4 человека	R&D	MAB4219
Антитело к клаудину-6 человека	R&D	MAB3656
Антитело к клаудину-9 человека	antibodies-online	ABIN1720917
IgG2A крысы	R&D	MAB006
IgG2A мыши	R&D	MAB003
IgG2B мыши	R&D	MAB004
IgG2B крысы	R&D	MAB0061
Антитело к клаудину-2 человека (PR005080)	Полученное внутрилабораторно	
Iso hIgG1	CrownBio	C0001-4

Антитело козы к IgG человека AffiniPure с Alexa Fluor® 647, специфическое в отношении фрагмента Fcγ	Jackson	109-605-098
Антитело козы к IgG мыши AffiniPure с Alexa Fluor® 647 (подклассы 1+2a+2b+3), специфическое в отношении фрагмента Fcγ	Jackson	115-605-164
Антитело козы к IgG крысы AffiniPure с Alexa Fluor® 647, специфическое в отношении фрагмента Fcγ	Jackson	112-605-071

Пример 15. Аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 с белками-мишенями яванского макака

Антитела анализировали посредством FACS в отношении аффинности связывания. Тестируемые клетки включают клетки HEK293, экспрессирующие CLDN18.2 яванского макака (HEK293/cynoCLDN18.2), клетки HEK293, сверхэкспрессирующие CLDN18.1 яванского макака (HEK293/cynoCLDN18.1), и CD3-положительные Т-клетки яванского макака. CD3-положительные Т-клетки выделяли из PBMC яванского макака с использованием набора для выделения CD3-клеток примата, отличного от человека (Miltenyi, 130-092-012). Аффинность связывания определяли следующим образом: клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а затем ресуспендировали в буфере для FACS (PBS, содержащий 2% FBS). Плотность клеток регулировали до 10^6 клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл суспензии клеток. Антитела разбавляли до различных концентраций буфером для FACS и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 50 мкл разбавления антител. После 2 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Затем добавляли буфер для FACS, содержащий конъюгированное с APC вторичное антитело козы к IgG человека (конечная концентрация 1,5 мкг/мл, Jackson, 109-605-098). После 1 ч. инкубации при 4°C планшет дважды промывали буфером для FACS. Клетки ресуспендировали в фиксирующем растворе и проводили анализ FACS (ACEA NovoCyte). На фиг. 8 и в таблице 26 показана аффинность связывания антител с клетками HEK293, сверхэкспрессирующими CLDN18.1 и CLDN18.2 яванского макака, а также с CD3-положительными Т-клетками в PBMC яванского макака. Все тестируемые антитела могут связываться с клетками, экспрессирующими CLDN18.2 и CD3, и не связываются с клетками, экспрессирующими CLDN18.1.

Таблица 26. Аффинность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток

Антитело	Титр EC ₅₀ (нМ)	
	HEK293/cynoCLDN18.2	CD3+ Т-клетка
PR004549	18,2	
PR005411	62,8	
PR006292	11,1	
PR006384	8,50	NA
PR000400	11,7	
	6,50	

Пример 16. Активность в виде TDCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3 в отношении клеток, экспрессирующих CLDN18.2 яванского макака

Биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 анализировали на активность, состоящую в способности вызывать TDCC-эффект в отношении HEK293/cynoCLDN18.2, с использованием набора для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96[®] (Promega, G1780). CD3-положительные Т-клетки выделяли из PBMC яванского макака с использованием набора для выделения CD3-клеток примата, отличного от человека (Miltenyi, 130-092-012). Т-клетки яванского макака и клетки-мишени ресуспендировали в среде (RPMI1640 + 5% FBS). Плотность клеток-мишеней регулировали до 3×10^5 клеток/мл, а плотность Т-клеток регулировали до $1,2 \times 10^6$ /мл. Добавляли по 50 мкл каждого типа клеток в лунки 96-луночного планшета (соотношение эффектора и мишени составляло 4:1). Тестируемое антитело разбавляли средой (RPMI1640+5% FBS) до различных концентраций и добавляли по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24 ч., а затем для получения лизата добавляли 10× Triton-X 100 (RPMI1640 + 5% FBS + 10% Triton-X 100) в контрольную лунку с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями и контрольную лунку для коррекции объема. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 0,5 ч. 96-луночный планшет центрифугировали при 400 g в течение 4 мин. Отбирали 50 мкл надосадочной жидкости, а затем добавляли хромогенный раствор LDH в концентрации 50 мкл/лунка. После отстаивания смеси в отсутствие светового излучения при комнатной температуре в течение 20 мин. планшет считывали на приборе MD StakMax (OD₄₉₀). Для расчета результатов сначала рассчитывались скорректированные показания. Показание контрольной лунки для учета обеспечиваемого средой фона вычитали из показаний экспериментальных лунок, контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями и контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH

эффекторными клетками, а затем показание контрольной лунки для коррекции объема вычитали из показания контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями. Активность в виде TDCC (%) = (скорректированное показание экспериментальной лунки - скорректированное показание контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками - контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями)/(скорректированное показание контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями - контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями) × 100. На фиг. 9 показана активность в виде TDCC, индуцированная антителами к HEK293/cynoCLDN18.2. Конкретные значения показаны в таблице 27.

Таблица 27. Активность в виде TDCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Антитело	EC ₅₀ (нМ)
	HEK293/cynoCLDN1
	8.2
PR006292	76,8

Пример 17. Анализ высвобождения цитокинов *in vitro*

Биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 анализировали в отношении индуцированного высвобождения цитокинов *in vitro* с использованием PBMC человека для предсказания безопасности антител. PBMC инкубировали с антителами либо в присутствии, либо в отсутствие клеток HEK293/hCLDN18.1. PBMC и HEK293/hCLDN18.1 ресуспендировали в среде (RPMI1640 + 10% FBS). Плотность клеток HEK293/hCLDN18.1 регулировали до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, а плотность клеток PBMC регулировали до 2×10^6 /мл. Добавляли 100 мкл клеток HEK293/hCLDN18.1 и 200 мкл PBMC в лунки 48-луночного планшета. Тестируемые антитела разбавляли средой (RPMI1640+10% FBS) до различных концентраций и добавляли по 100 мкл в лунки 48-луночного планшета до конечного объема 400 мкл. В качестве положительного контроля использовали LPS (Sigma, L6529). В качестве отрицательного контроля использовали антитело Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4). Образцы инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Надосадочную жидкость центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. и собирали 300 мкл супернатанта. Концентрации IL-6 (Invitrogen, 88-7066) и TNF-α (Invitrogen, 88-7346) в надосадочной жидкости определяли количественно посредством ELISA. На фиг. 10 показано высвобождение цитокинов, индуцированное антителами *in vitro*. Высвобождение IL-6 и TNF-α, индуцированное PR004549, выше, чем таковое, индуцированное PR006292, в отсутствие клеток с мишенью, представляющей собой CLDN18.2, что указывает на лучший профиль безопасности PR006292.

Пример 18. Активность в виде ADCC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Биспецифические антитела к CLDN18.2×CD3 анализировали на активность, состоящую в способности вызывать ADCC-эффект в отношении клеток Jurkat и HEK293/hCLDN 18.2, с использованием набора для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, G1780). PBMC человека центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. и культивировали в среде (RPMI1640 + 10% FBS) в течение ночи. NK-клетки выделяли из PBMC человека с использованием набора для выделения NK-клеток человека (Miltenyi, 130-092-657). Клетки Jurkat центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а NK-клетки человека – при 300 g в течение 10 мин. Затем клетки ресуспендировали в среде (RPMI1640 + 5% FBS). Плотность клеток-мишеней регулировали до 3×10^5 клеток/мл, а плотность NK-клеток регулировали до $1,8 \times 10^6$ /мл. Добавляли по 50 мкл каждого типа клеток в лунки 96-луночного планшета (соотношение эффектора и мишени составляло 6:1). Тестируемые антитела разбавляли средой (RPMI1640+5% FBS) до различных концентраций и добавляли по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета. Образцы инкубировали при 37°C в течение 5 ч., а затем для получения лизата добавляли $10 \times$ Triton-X 100 (RPMI1640 + 5% FBS + 10% Triton-X 100) в контрольную лунку с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями и контрольную лунку для коррекции объема. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 0,5 ч. 96-луночный планшет центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Отбирали 50 мкл надосадочной жидкости, а затем добавляли хромогенный раствор LDH в концентрации 50 мкл/лунка. После отстаивания смеси в отсутствие светового излучения при комнатной температуре в течение 20 мин. планшет считывали на приборе MD StakMax (OD₄₉₀). PR003767 использовали в качестве положительного контроля, а антитело Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) – в качестве отрицательного контроля. Для расчета результатов сначала рассчитывались скорректированные показания. Показание контрольной лунки для учета обеспечиваемого средой фона вычитали из показаний экспериментальных лунок, контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями и контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками, а затем показание контрольной лунки для коррекции объема вычитали из показания контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями. Активность в виде ADCC (%) = (скорректированное показание экспериментальной лунки - скорректированное показание контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками - контрольной лунки для учета спонтанного высвобождения LDH клетками-мишенями)/(скорректированное показание контрольной лунки с максимальным высвобождением LDH клетками-мишенями - контрольной лунки для учета спонтанного

высвобождения LDH клетками-мишенями) $\times 100$. На фиг. 11(a) показана активность в виде ADCC антител в отношении клеток Jurkat. PR006292 и PR004549 были не способны вызывать ADCC-эффекты в отношении клеток Jurkat.

Биспецифические антитела к CLDN18.2 \times CD3 анализировали на активность, состоящую в способности вызывать ADCC-эффект в отношении NUGC4_D8, с использованием клеток NK92/CD16a. NUGC4_D8 и NK92/CD16a ресуспендировали в среде (RPMI1640 + 5% FBS). Плотность клеток-мишеней регулировали до 3×10^5 клеток/мл, а плотность клеток NK92/CD16a регулировали до $1,8 \times 10^6$ /мл. Добавляли по 50 мкл каждого типа клеток в лунки 96-луночного планшета (соотношение эффектора и мишени составляло 6:1). Тестируемые антитела разбавляли средой (RPMI1640+5% FBS) до различных концентраций и добавляли по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета. Образцы инкубировали при 37°C в течение 5 ч. В качестве положительного контроля использовали PR003197. На фиг. 11(b) показана активность в виде ADCC антител в отношении NUGC4_D8. PR006292 и PR004549 были не способны вызывать ADCC-эффекты в отношении клеток NUGC4_D8.

Пример 19. Активность в виде CDC биспецифических антител к CLDN18.2 \times CD3

Антитела CLDN18.2 анализировали в отношении CDC-эффектов в отношении клеток HEK293/hCLDN18.2 и Jurkat с использованием набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, G7573). Клетки-мишени центрифугировали при 300 g в течение 5 мин., а затем ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI1640. Плотность клеток-мишеней регулировали до 2×10^5 клеток/мл и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 25 мкл суспензии клеток. Антитела разбавляли бессывороточной средой до различных концентраций и в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 25 мкл разбавления антител. Добавляли 50 мкл нормальной человеческой сыворотки (культура клеток Access, 515) до конечной концентрации 50% и полученную в результате смесь инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Обеспечивали отстаивание 96-луночного планшета при комнатной температуре в течение 30 мин. и в каждую лунку добавляли по 100 мкл хромогенного раствора CellTiter-Glo при комнатной температуре. Затем образец инкубировали в отсутствие светового излучения при комнатной температуре в течение 10 мин. Планшет считывали с помощью PE Enspire. Активность в виде CDC (%) = $[1 - (\text{люминесцентный образец})/(\text{люминесцентный имитационный контроль})] \times 100$. Аналог IMAV362 использовали в качестве положительного контроля, а антитело Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) – в качестве отрицательного контроля. На фиг. 12 показана активность в виде CDC антитела PR006292 в отношении клеток Jurkat и клеток HEK293, сверхэкспрессирующих

CLDN18.2 человека. PR006292 индуцировало более значительный CDC-эффект, чем таковой, индуцированный PR004549, в HEK293/hCLDN18.2, тогда как в клетках Jurkat активность в виде CDC не наблюдалась. Активность в виде CDC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3, в частности, показана в таблице 28.

Таблица 28. Активность в виде CDC биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Клетка		PR006292	PR004549
HEK293/hCLDN18.2	Максимальная степень уничтожения (%)	71,8	0,00
	EC ₅₀ (нМ)	37,1	NA
Jurkat	Максимальная степень уничтожения (%)	0,00	0,00
	EC ₅₀ (нМ)	NA	NA

Пример 20. Конкурентная активность связывания биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Данный пример предназначен для исследования связывания биспецифических антител к CLDN18.2 человека с эпитопной областью антигена CLDN18.2 человека. Эксперименты по конкурентному связыванию осуществляли на клеточном уровне с использованием клеток HEK293/hCLDN18.2, сверхэкспрессирующих CLDN18.2 человека. Вкратце, антитела к CLDN18.2 человека, PR000400 и PR004549, биотинилировали с использованием набора для биотинилирования (ThermoFisher, A35358) в соответствии с инструкциями. В 96-луночный планшет с V-образным дном (Corning, 3894) добавляли клетки в концентрации 2×10^6 клеток/мл и суспензию клеток HEK293T/hCLDN18.2, сверхэкспрессирующих CLDN18.2 человека, в концентрации 50 мкл/лунка с последующим добавлением 25 мкл биотинилированного антитела к CLDN18.2 человека, – PR000400 или PR004549. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Добавляли 25 мкл соответствующего серийно разбавленного небитинилированного антитела к CLDN18.2 человека. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Клетки в каждой лунке промывали дважды с помощью 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS (2% BSA в DPBS) и центрифугировали при 500 g, при 4°C в течение 5 мин., а затем надосадочную жидкость удаляли. Добавляли флуоресцентное вторичное антитело (Jackson ImmunoResearch, 016-540-084, 1:500). Смесь инкубировали при 4°C в отсутствие светового излучения в течение 1 ч. Клетки в каждой лунке промывали дважды с помощью 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS (2% BSA в DPBS) и

центрифугировали при 500 g, при 4°C в течение 5 мин., а затем надосадочную жидкость удаляли. Наконец, клетки в каждой лунке ресуспендировали в 200 мкл предварительно охлажденного буфера для FACS и считывали значения сигнала флуоресценции с использованием ACEA_NovoCyte. Степень ингибирования рассчитывали с использованием следующей формулы: степень ингибирования (%) = (A - B)/A × 100 (примечание: A – сигнал флуоресценции после взаимодействия биотинилированного антитела с ISO (hIgG1) (Crownbio, c0001-4); B – сигнал флуоресценции после взаимодействия биотинилированного антитела с небитинилированным антителом).

Как показано на фиг. 13 и в таблице 29, все биспецифические антитела к CLDN18.2 по настоящему изобретению способны блокировать связывание PR000400 или PR004549 с CLDN18.2 человека, и выявленная блокирующая способность антител повышается с увеличением концентрации антител положительно коррелирующим образом, что указывает на то, что эти антитела имеют эпитопы, очень похожие на эпитопы для PR000400 и PR004549. Тестируемые антитела характеризуются низкой аффинностью связывания в отношении клеток HEK293/hCLDN18.1. Из представленных выше результатов можно сделать вывод, что тестируемые антитела связываются с белком CLDN18.2 человека в ECL1 (внеклеточная петля 1), а не в ECL2.

Таблица 29. Способность конкурентного связывания антител к CLDN18.2 в отношении антител PR000400 и PR004549

Антитело	10 нМ биотинилированного PR000400		200 нМ биотинилированного PR004549	
	IC50 (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)	IC50 (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)
PR005397	81,8	98,4	67,5	48,0
PR006384	103	97,8	56,7	48,5
PR005411	122	96,2	74,4	48,0
PR006292	87,7	97,7	70,8	48,1
PR006293	132	97,8	100	48,0
PR000400	36,2	92,7	25,2	52,3
PR004549	NA	35,5	NA	16,7
ISO hIgG1	NA	0,00	NA	0,00

Пример 21. Исследование фармакокинетики биспецифических антител к CLDN18.2×CD3

Исследования фармакокинетики проводили следующим образом с использованием бестимусных мышей BALB/c. Отбирали 6 самок бестимусных мышей BALB/c весом 18–

22 г, которые получали дозы антитела путем внутривенной инъекции при дозе 5 мг/кг. Цельную кровь 3 мышей в одной группе собирали до введения и через 15 мин., 24 ч. (1 день), 4 дня и 10 дней после введения, а цельную кровь 3 мышей в другой группе собирали до введения и через 5 ч., 2 дня, 7 дней и 14 дней после введения. Обеспечивали отстаивание цельной крови в течение 30 мин. для коагуляции, а затем центрифугировали. Выделенный образец сыворотки криоконсервировали при температуре -80°C , прежде чем отправить на анализ. Концентрацию лекарственного средства в сыворотке крови мыши определяли количественно посредством ELISA. Общий ELISA (общий способ) осуществляли путем улавливания человеческих Fc-содержащих антител в сыворотке крови мыши с использованием поликлонального антитела козы к Fc человека и выявления с помощью HRP-меченых вторичных антител козы к Fc человека. ELISA для выявления CLDN18.2-связывающего домена (способ Free X) осуществляли путем захвата антител, содержащих связывающий домен CLDN18.2, в сыворотке крови мышей с использованием белка CLDN18.2 и выявления с помощью HRP-меченого вторичного антитела козы к Fc человека. Данные о концентрации в плазме крови анализировали с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin (версия 8.2) посредством некомпартментного анализа (NCA) для оценки фармакокинетических параметров.

Фармакокинетика PR006292, PR006384 и PR004549 показана на фиг. 14, а фармакокинетические параметры показаны в таблице 30. PR006292 и PR006384 превосходят PR004549 по стабильности у мышей и характеризуются длительными периодами полужизни и высоким значением воздействия лекарственного средства у мышей.

Таблица 30. Фармакокинетические параметры PR006292, PR006384 и PR004549

Способ	PR004549		PR006292		PR006384	
	Общий анализ	Анализ домена	Общий анализ	Анализ домена	Общий анализ	Анализ домена
$T_{1/2}$ (ч.)	7,395±606	5,714±464	7,395±606	5,714±464	6,352±325	5,751±192
V_d (мл/кг)	100	77,2	100	77,2	100	90,5
AUC_{all} (мкг/мл ч.)	106	94,1	106	94,1	106	89,7
AUC (%)*	121	132	121	132	141	112
Cl (мл/ч./кг)	0,5	0,73	0,5	0,73	0,59	0,76
C_0 (мкг/мл)	173	135	173	135	198	130

*AUC (%) = AUC/AUC (общий анализ; среднее значение) $\times 100$

Пример 22. Фармакодинамические исследования *in vivo* биспецифических антител к CLDN18.2×CD3*Модель опухоли NUGC4_D8*

Исследования фармакодинамики *in vivo* осуществляли с использованием мышей NCG для воссоздания модели опухоли NUGC4_D8 в иммунной системе, предусматривающей РВМС человека. В частности, способ заключается в следующем. В день инокуляции клеток каждой мыши NCG подкожно инокулировали клетки NUGC4_D8 и РВМС. Когда средний объем опухоли в каждой группе мышей достигал 90 мм³, мышей разделяли на группы и всего осуществляли одно введение через хвостовые вены. После начала введения вес тела и объем опухоли измеряли дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали следующим образом: объем опухоли (мм³) = 0,5 × размер по длинной оси опухоли × размер по короткой оси опухоли². Данные анализировали с использованием t-критерия.

Обеспечиваемые PR005397, PR005411 и PR004549 противоопухолевые эффекты *in vivo* показаны на фиг. 15(а). В частности, средний объем опухоли у контрольной группы мышей с Iso hIgG1 в день 25 после инокуляции составлял 1897 мм³. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,2 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 104 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 94,48%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 538 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 71,61%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR005411 (0,2 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 30 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 98,39%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR005411 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 263 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 86,1%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR005397 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 327 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 82,75%. На протяжении всего

лечения животные демонстрировали хорошую переносимость лекарственных средств без значительной потери веса и случаев гибели животных. Обеспечиваемые PR005397 и PR005411 противоопухолевые эффекты *in vivo* превосходят таковые, обеспечиваемые PR004549.

Противоопухолевые эффекты *in vivo* PR006292, PR006293, PR006384 и PR004549 показаны на фиг. 15(b). В частности, средний объем опухоли у контрольной группы мышей с Iso hIgG1 в день 25 после инокуляции составлял 1355 мм³. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,2 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 408 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение = 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 69,83%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 743 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение = 0,0037) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 45,15%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006293 (0,2 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 39 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 97,06%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006293 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 190 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 85,96%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006384 (0,2 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 81 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение < 0,0001) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 94%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006384 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 752 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение = 0,0071) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 44,47%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006292 (0,04 мг/кг) в день 25 после инокуляции составлял 580 мм³, демонстрируя значительное различие (р-значение = 0,0006) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 57,15%. На протяжении всего

лечения животные демонстрировали хорошую переносимость лекарственных средств без значительной потери веса и случаев гибели животных. Обеспечиваемые PR006292, PR006293 и PR006384 противоопухолевые эффекты *in vivo* превосходят таковые, обеспечиваемые PR004549.

Модель опухоли SNU620 PBMC

Исследования фармакодинамики *in vivo* осуществляли с использованием мышей NCG для воссоздания модели опухоли SNU620 в иммунной системе, предусматривающей PBMC человека. В частности, способ заключается в следующем. В день инокуляции клеток каждой мыши NCG подкожно инокулировали опухолевые клетки SNU620. Когда средний объем опухоли в каждой группе мышей достигал 70 мм³, мышей разделяли на группы и всего осуществляли четыре введения через хвостовые вены. После начала введения вес тела и объем опухоли измеряли дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали следующим образом: объем опухоли (мм³) = 0,5 × размер по длинной оси опухоли × размер по короткой оси опухоли². Данные анализировали с использованием t-критерия.

Обеспечиваемые PR006292 и PR004549 противоопухолевые эффекты *in vivo* показаны на фиг. 15(a). В частности, средний объем опухоли у контрольной группы мышей с Iso hIgG1 в день 36 после инокуляции составлял 847 мм³. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006292 (0,2 мг/кг) в день 36 после инокуляции составлял 131 мм³, демонстрируя значительное различие (p-значение = 0,0076) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 84,53%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006292 (0,04 мг/кг) в день 36 после инокуляции составлял 505 мм³, демонстрируя отсутствие значительного различия (p-значение = 0,3856) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 40,36%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,2 мг/кг) в день 36 после инокуляции составлял 858 мм³, демонстрируя значительное различие (p-значение > 0,9999) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла -1,28%. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR004549 (0,04 мг/кг) в день 36 после инокуляции составлял 844 мм³, демонстрируя значительное различие (p-значение > 0,9999) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 0,39%. На протяжении всего лечения животные демонстрировали хорошую переносимость лекарственных средств без значительной потери веса и случаев гибели животных.

Модель опухоли HuP-T4 PBMC

Исследования фармакодинамики *in vivo* осуществляли с использованием мышей NCG для воссоздания модели опухоли HuP-T4 в иммунной системе, предусматривающей PBMC человека. В частности, способ заключается в следующем. В день инокуляции клеток каждой мыши NCG подкожно инокулировали опухолевые клетки HuP-T4. Когда средний объем опухоли в каждой группе мышей достигал 130 мм³, мышей разделяли на группы и всего осуществляли четыре введения через хвостовые вены. После начала введения вес тела и объем опухоли измеряли дважды в неделю. Объем опухоли рассчитывали следующим образом: объем опухоли (мм³) = 0,5 × размер по длинной оси опухоли × размер по короткой оси опухоли². Данные анализировали с использованием t-критерия.

Обеспечиваемый PR006292 противоопухолевый эффект *in vivo* показан на фиг. 15(d). В частности, средний объем опухоли у контрольной группы мышей с Iso hIgG1 в день 36 после инокуляции составлял 1059 мм³. Средний объем опухоли в группе лечения тестируемым лекарственным средством на основе PR006292 (0,5 мг/кг) в день 36 после инокуляции составлял 129 мм³, демонстрируя значительное различие (p-значение = 0,0022) по сравнению с объемом в контрольной группе с Iso hIgG1, при этом степень подавления роста опухоли, TGI (%), составляла 87,75%. На протяжении всего лечения животные демонстрировали хорошую переносимость лекарственных средств без значительной потери веса и случаев гибели животных.

Тест высвобождения цитокинов in vivo у мышей

Исследования цитокинового шторма *in vivo* осуществляли с использованием мышей NCG для воссоздания в иммунной системе, предусматривающей PBMC человека. В частности, способ заключается в следующем. Каждой мыши NCG внутривенно вводили 2 × 10⁷ PBMC человека, а на следующий день внутривенно вводили PR006292, PR004549 и контрольные антитела подкласса IgG1. Кровь брали для сбора сыворотки крови в 0 ч. (до введения), через 4 и 24 ч. после введения. Способ MSD применяли для определения уровней различных цитокинов в сыворотке крови, включая IFN-γ, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 и TNF-α. Данные анализировали с использованием t-критерия.

На фиг. 15(e) показана экспрессия части цитокинов, которые были выявляемы в сыворотке крови мыши через 4 ч. после инъекции антител. Результаты показали, что PR006292 индуцировало более низкое высвобождение цитокинов, таких как IFN-γ, IL-2 и TNF-α, по сравнению с контрольным антителом PR004549, что указывает на лучшую безопасность.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, нацеливающееся на CLDN18.2, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 16–18, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42–46 и SEQ ID NO: 48–54, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 77–82.

2. Антитело по п. 1, где HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 77 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 80 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 80 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 81 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 82 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 78 соответственно.

3. Антитело по п. 1, где переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит каркасные области, при этом HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 или 7, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 28–34, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 63–68, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 84 и 86–89.

4. Антитело по п. 3, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 150–157 и SEQ ID NO: 159–165.

5. Антитело по п. 1, где антитело дополнительно содержит константную область тяжелой цепи; при этом предпочтительно константная область тяжелой цепи выбрана из hIgG1, hIgG2, hIgG3 и hIgG4 и их вариантов; более предпочтительно константная область тяжелой цепи представляет собой hIgG1.

6. Антитело по любому из пп. 1–5, где антитело представляет собой полноразмерное антитело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, антитело в виде тяжелой цепи, или однодоменное антитело, или моноклональное или поликлональное антитело, полученные из антител, указанных выше.

7. Антитело по п. 6, где антитело представляет собой однодоменное антитело, содержащее аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 182–189 и SEQ ID NO: 191–197.

8. Биспецифическое антитело, содержащее первую функциональную область белка, нацеливающуюся на CD3, и вторую функциональную область белка, нацеливающуюся на CLDN18.2; где

первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме VH и предпочтительно содержит 2 или 3 VH; если вторая функциональная область белка содержит 3 VH, связанные последовательно, то каждая из первой функциональной области белка и второй функциональной области белка связана с двойной цепью Fc; если вторая функциональная область белка содержит 2 VH, связанные последовательно, то каждая из первой функциональной области белка и второй функциональной области белка связана с двойной

цепью Fc; если вторая функциональная область белка содержит 3 VH и одна из 3 VH связана с первой функциональной областью белка, то оставшиеся две VH связаны последовательно, и первая функциональная область белка и две связанные последовательно VH второй функциональной области белка связаны с двойной цепью Fc;

альтернативно первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме HCAb;

альтернативно первая функциональная область белка представлена в форме Fab, и вторая функциональная область белка представлена в форме VH-HCAb, при этом вторая функциональная область белка предпочтительно содержит всего 4 VH.

9. Биспецифическое антитело по п. 8, где вторая функциональная область белка содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, при этом HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 16–18, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 42–46 и SEQ ID NO: 48–54, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 77–82;

предпочтительно HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 77 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 78 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 79 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 содержат аминокислотные

последовательности, представленные под SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 78 соответственно;

более предпочтительно вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 150–152 и SEQ ID NO: 159–165.

10. Биспецифическое антитело по п. 8 или п. 9, где первая функциональная область белка содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные под SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 131 соответственно, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 72 соответственно;

предпочтительно вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO: 144, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 168.

11. Биспецифическое антитело по п. 8 или п. 9, где

биспецифическое антитело содержит три полипептидные цепи в следующих формах:

два N-конца Fc связаны с Fab и VH соответственно; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3 или $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1-шарнир-CH2-CH3, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL;

альтернативно один C-конец HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VL_{CD3} -CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -CH1; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-CH3- VH_{CD3} -CH1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -CL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-CH2-

СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ- VL_{CD3} -СL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -СН1;

альтернативно N-конец тяжелой цепи Fab связан с одной $VH_{CLDN18.2}$, C-конец тяжелой цепи связан с одним N-концом Fc, и C-конец последовательно связанных VH связан с другим N-концом Fc; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ - VH_{CD3} -СН1-шарнир-СН2-СНЗ, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -СL;

более предпочтительно различные функциональные единицы, такие как VH, СН2-СНЗ и VL, функционально связаны линкерными пептидами, предпочтительно содержащими аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 244–248, предпочтительно последовательность, представленную под SEQ ID NO: 246;

более предпочтительно два N-конца Fc связаны с Fab и VH соответственно; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ или $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -СН1-шарнир-СН2-СНЗ, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -СL;

альтернативно один C-конец HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ-линкерный пептид- VH_{CD3} -СН1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -СL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ-линкерный пептид- VL_{CD3} -СL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3} -СН1;

альтернативно один C-конец VH-HCAb связан с VH или VL Fab; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ-линкерный пептид- VH_{CD3} -СН1, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3} -СL; альтернативно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид- $VH_{CLDN18.2}$ -шарнир-СН2-СНЗ, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле $VH_{CLDN18.2}$ -линкерный пептид-

VH_{CLDN18.2}-шарнир-CH2-CH3-линкерный пептид-VL_{CD3}-CL, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CD3}-CH1;

альтернативно N-конец тяжелой цепи Fab связан с одной VH_{CLDN18.2}, C-конец тяжелой цепи связан с одним N-концом Fc, и C-конец последовательно связанных VH связан с другим N-концом Fc; предпочтительно биспецифическое антитело имеет первую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CLDN18.2}-линкерный пептид-VH_{CLDN18.2}-шарнир-CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, как показано в формуле VH_{CLDN18.2}-линкерный пептид-VH_{CD3}-CH1-шарнир-CH2-CH3, и третью полипептидную цепь, как показано в формуле VL_{CD3}-CL.

12. Биспецифическое антитело по п. 11, где первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 214, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 219, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 220, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 221, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 222, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 213, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 238, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 239, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 240, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 241, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 242, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200;

альтернативно первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 243, вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 235, и третья полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 200.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12.

14. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 13, где предпочтительно рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой плазмиду, космиду, фаг или вирусный вектор, при этом вирусный вектор предпочтительно

представляет собой ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса.

15. Трансформант, предусматривающий рекомбинантный вектор экспрессии по п. 14 в клетке-хозяине, где предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку TG1, BL21 *E. coli* или клетку СНО-К1.

16. Химерный антигенный рецептор, содержащий антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12.

17. Генетически модифицированная клетка, содержащая антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12, где предпочтительно генетически модифицированная клетка представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно выделенную клетку человека и более предпочтительно иммунную клетку, такую как Т-клетка или НК-клетка.

18. Способ получения биспецифического антитела, включающий культивирование трансформанта по п. 15 и получение антитела или биспецифического антитела из культуры.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий цитотоксическое средство и антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12, где предпочтительно цитотоксическое средство представляет собой MMAF или MMAE.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12 и фармацевтически приемлемый носитель; где

предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

21. Применение антитела по любому из пп. 1–7, или биспецифического антитела по любому из пп. 8–12, или фармацевтической композиции по п. 20 в изготовлении лекарственного препарата для предупреждения или лечения CD3- и/или CLDN18.2-ассоциированного заболевания, где

заболевание предпочтительно представляет собой рак, при этом рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак почки, меланому, рак легкого, рак желудка, рак печени, рак пищевода, рак шейки матки, опухоль головы и шеи, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак мочевого пузыря, саркому или колоректальный рак; предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы,

рак яичника, рак эндометрия, рак почки или холангиокарциному; более предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы.

22. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12, химерный антигенный рецептор по п. 16, генетически модифицированную клетку по п. 17, или конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 19, или фармацевтическую композицию по п. 20;

предпочтительно набор дополнительно содержит (i) устройство для введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство, или фармацевтической композиции и/или (ii) инструкции.

23. Набор из частей, состоящий из набора А и набора В, где:

набор А содержит антитело по любому из пп. 1–7 или биспецифическое антитело по любому из пп. 8–12, химерный антигенный рецептор по п. 16, генетически модифицированную клетку по п. 17, конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 19 и/или фармацевтическую композицию по п. 20;

набор В содержит другие противоопухолевые антитела или фармацевтическую композицию, содержащую другие противоопухолевые антитела, и/или одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

24. Способ диагностики, лечения и/или предупреждения CLDN18.2-опосредованного заболевания или нарушения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–7 или биспецифического антитела по любому из пп. 8–12, химерного антигенного рецептора по п. 16, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 19 или фармацевтической композиции по п. 20, или лечения пациента, нуждающегося в этом, с помощью набора из частей по п. 23.

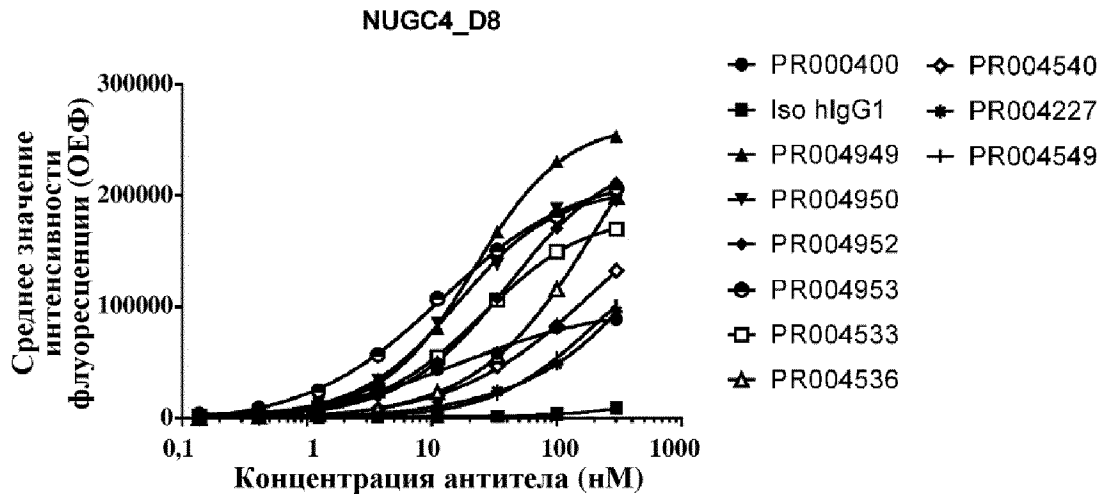
25. Способ по п. 24, где заболевание или нарушение представляет собой опухоль, предпочтительно CLDN18.2-положительную опухоль и более предпочтительно рак желудка, рак пищевода, рак легкого, рак яичника, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, рак печени, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, бронхиальную карциному, глиому и/или лейкоз.

26. Способ иммунологического выявления или определения CLDN18.2, включающий применение антитела по любому из пп. 1–7 или биспецифического антитела по любому из

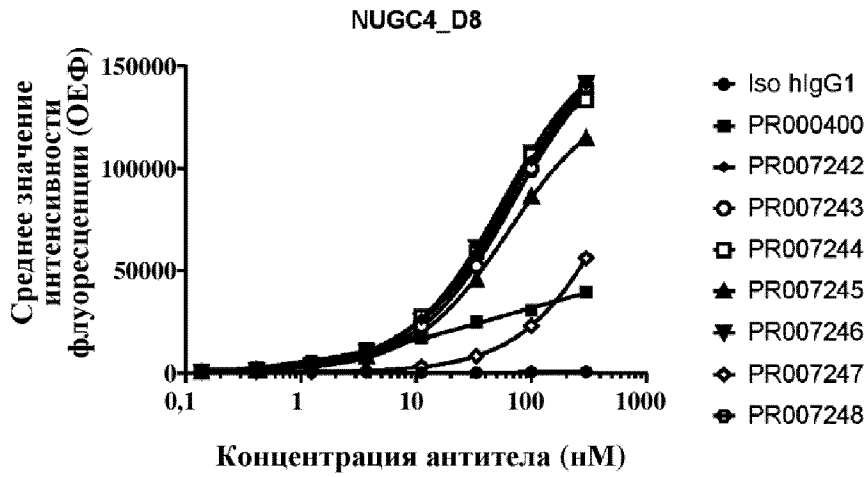
пп. 8–12, химерного антигенного рецептора по п. 16, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 19 или фармацевтической композиции по п. 20, где предпочтительно выявление осуществляют в целях, отличных от диагностических и/или терапевтических.

27. Комбинированная терапия, предусматривающая введение пациенту, нуждающемуся в этом, антитела по любому из пп. 1–7 или биспецифического антитела по любому из пп. 8–12, химерного антигенного рецептора по п. 16, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 19 или фармацевтической композиции по п. 20, и второго терапевтического средства, где второе терапевтическое средство предпочтительно предусматривает другие противоопухолевые антитела или фармацевтическую композицию, содержащую другие противоопухолевые антитела, и/или одно или несколько из группы, состоящей из гормонального средства, средства, нацеленного на малые молекулы, ингибитора протеасом, визуализирующего средства, диагностического средства, химиотерапевтического средства, онколитического лекарственного средства, цитотоксического средства, цитокина, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибирующей молекулы и вакцины.

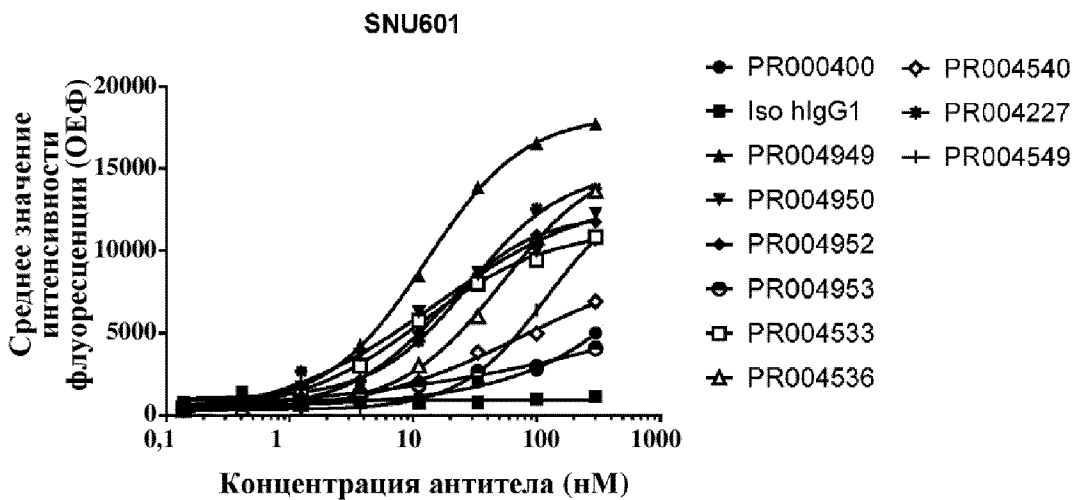
1a



1b



1c



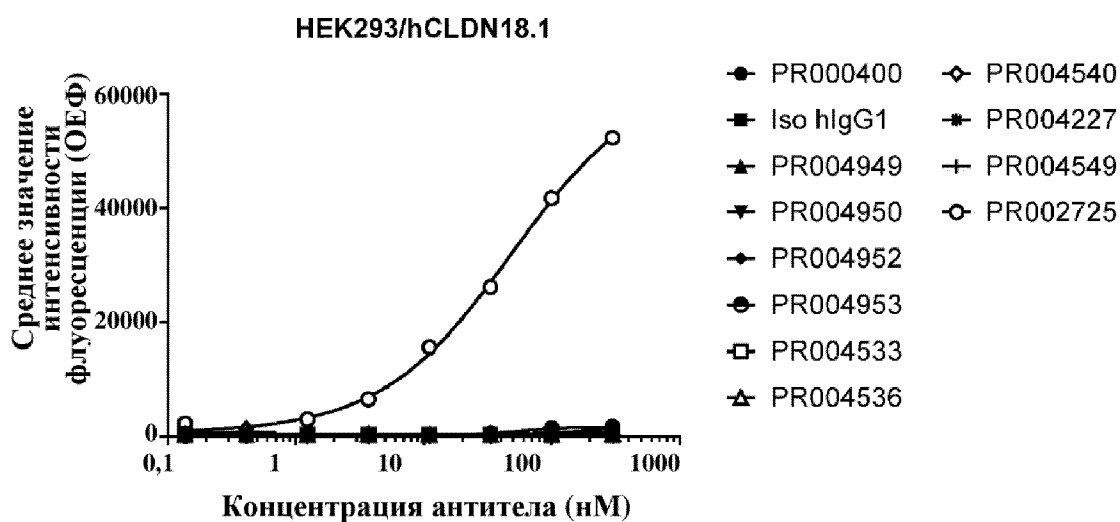
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

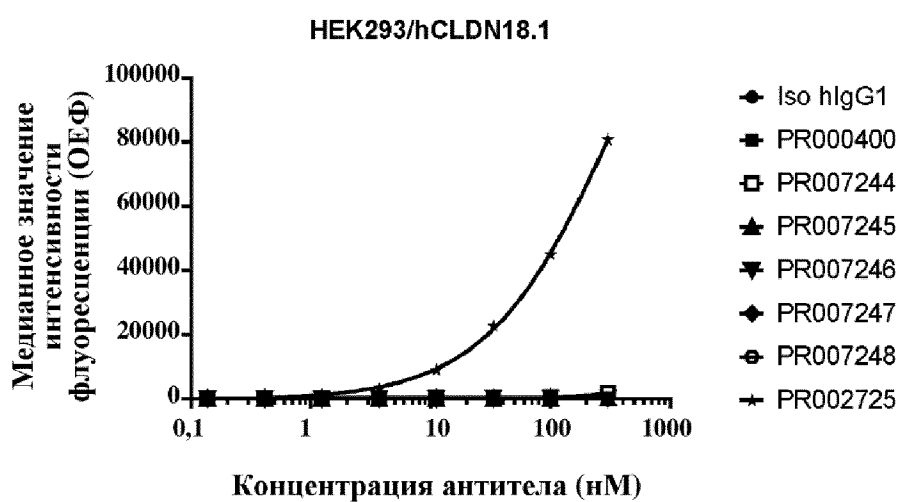
1d



1e



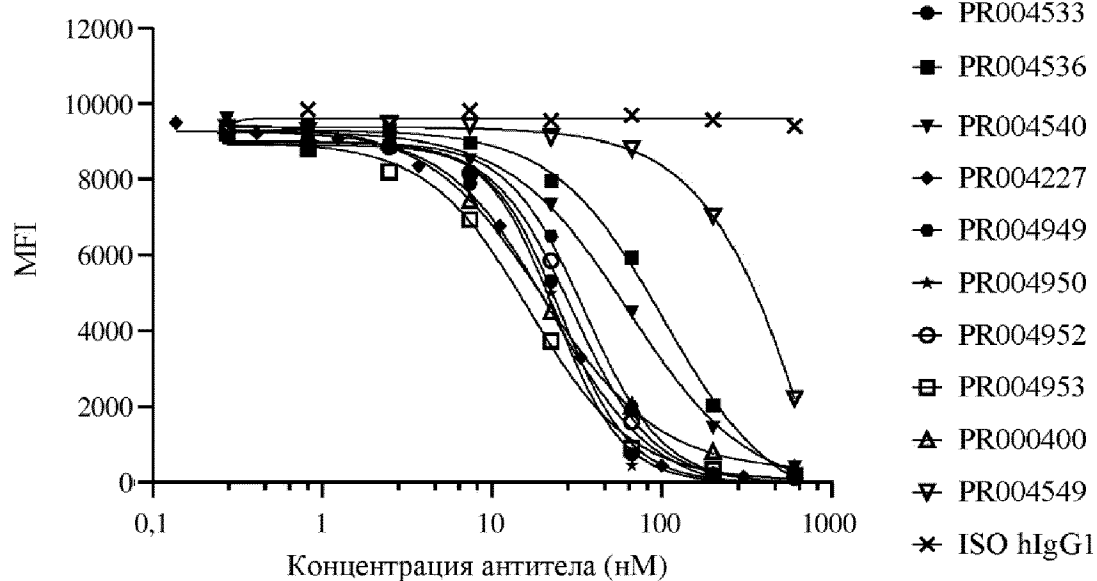
1f



Фиг. 1

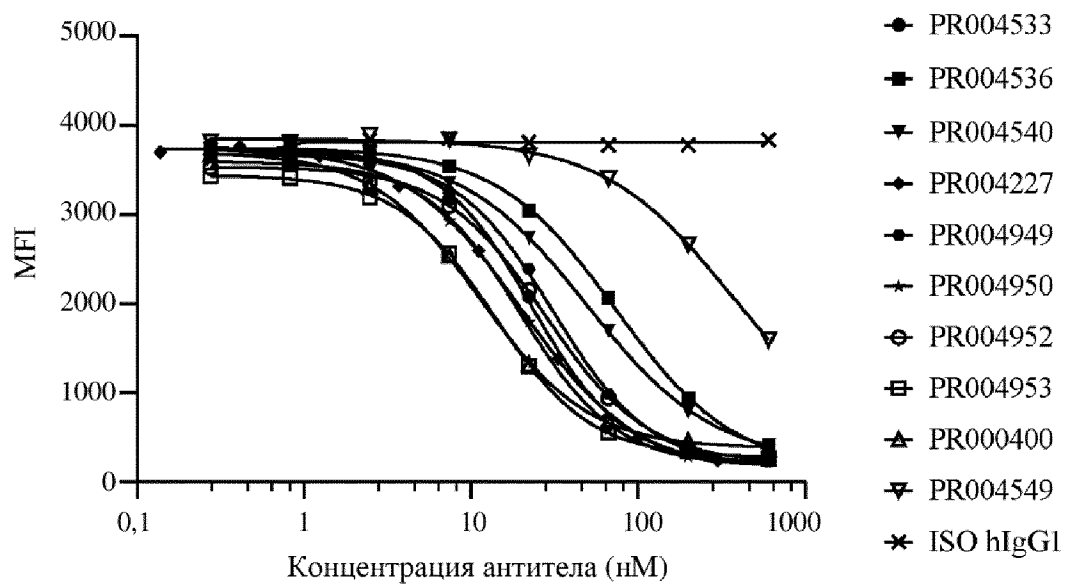
2а

Конкурентное связывание в присутствии
10 нМ биотинилированного PR000400



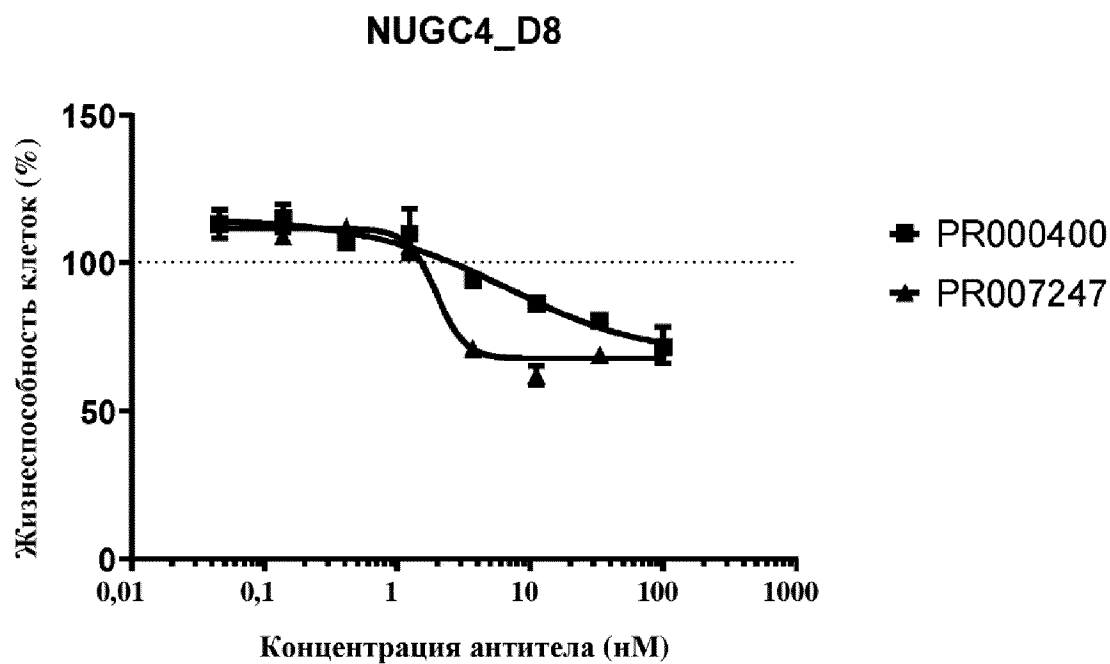
2б

Конкурентное связывание в присутствии
200 нМ биотинилированного PR004549

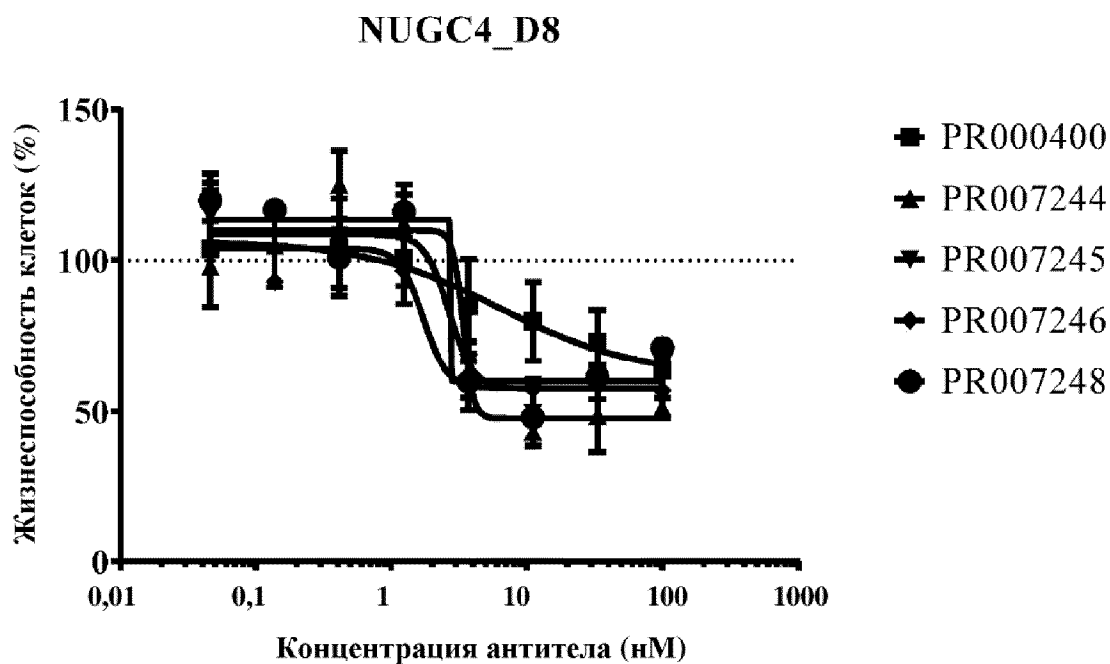


Фиг. 2

3a



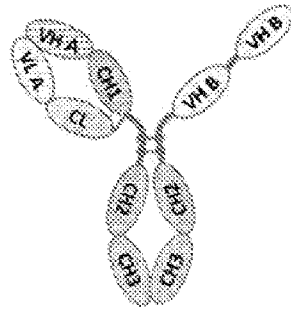
3b



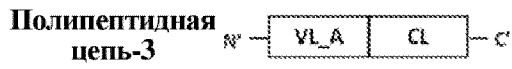
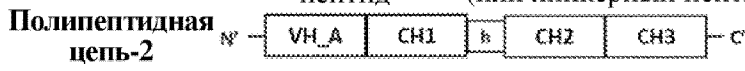
Фиг. 3

4a

Структура (1) Fab-Fc-двойная VH

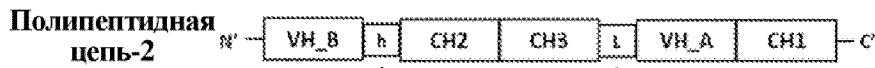
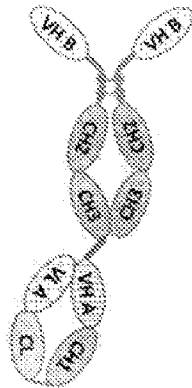


↑ Линкерный пептид ↑ Шарнирная область (или линкерный пептид)

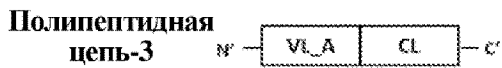


4b

Структура (2) HCAb_HC-Fab



↑ Шарнирная область (или линкерный пептид) ↑ Линкерный пептид

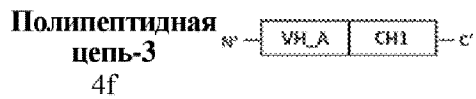
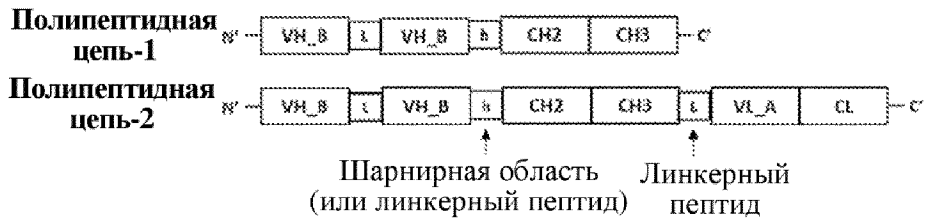
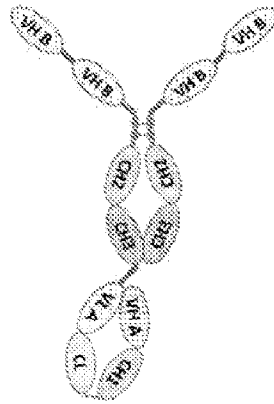


(продолжение на следующей странице)

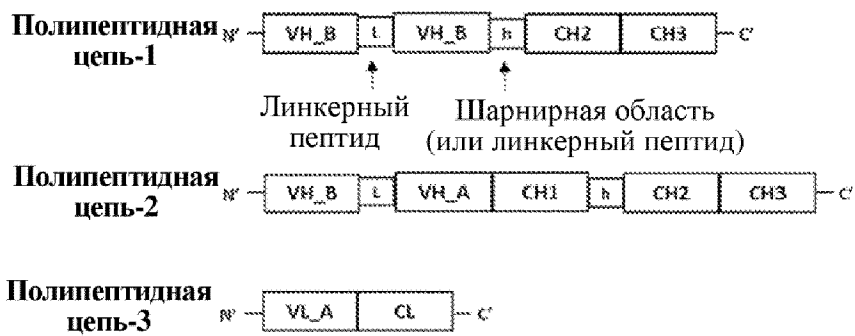
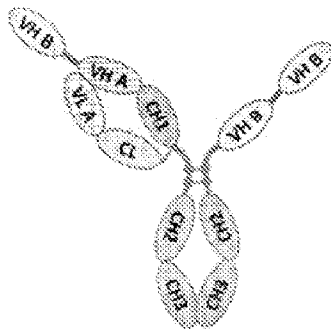
(продолжение с предыдущей страницы)

4e

Структура (5)

VH-VH_{LC}-Fab

Структура (6)

VH_{HC}-Fab-Fc-двойная VH

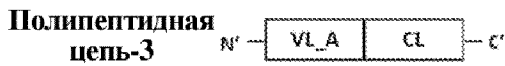
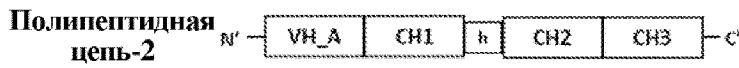
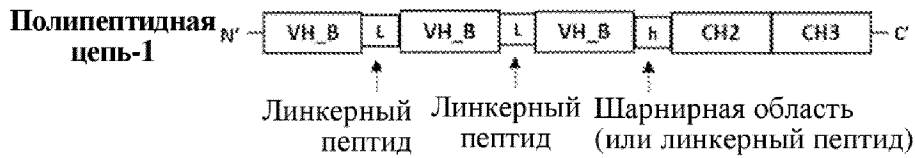
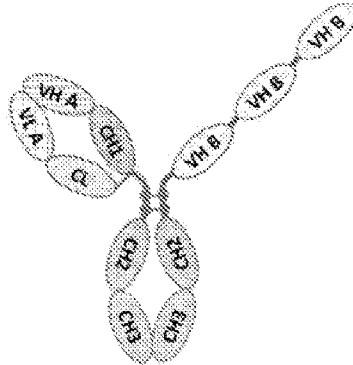
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

4g

Структура (7)

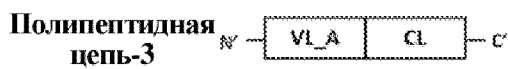
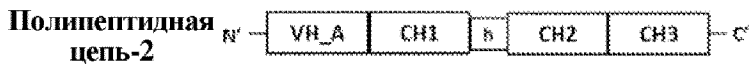
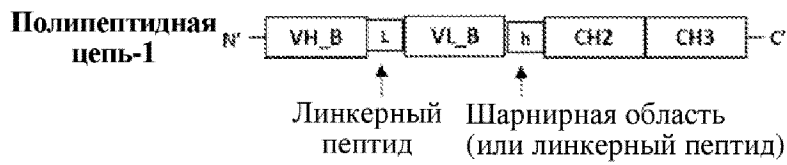
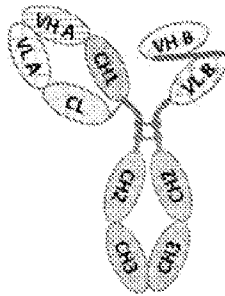
Fab-Fc-VH-VH-VH



4h

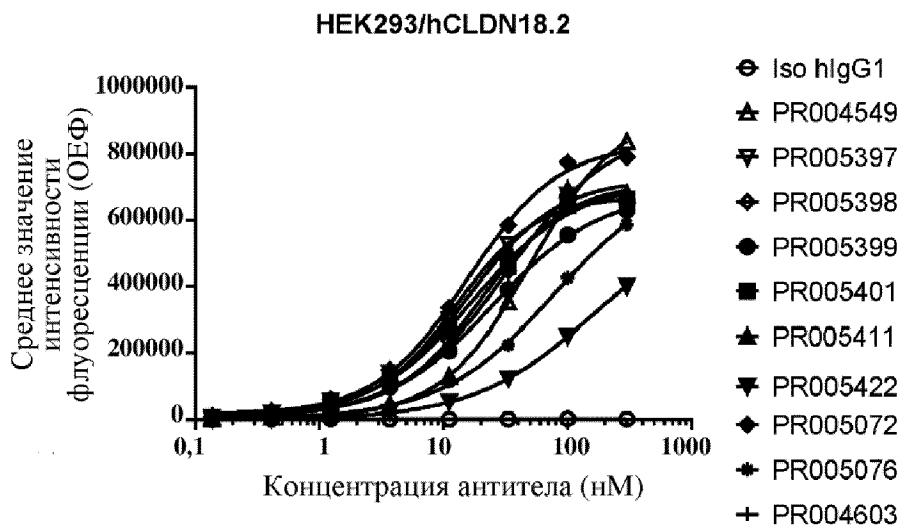
Структура (8)

Fab-Fc-scFv(VH-VL)

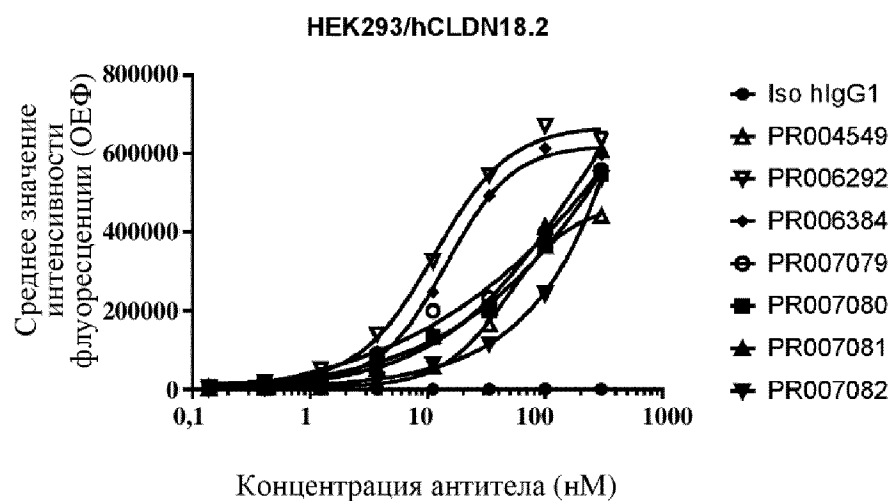


Фиг. 4

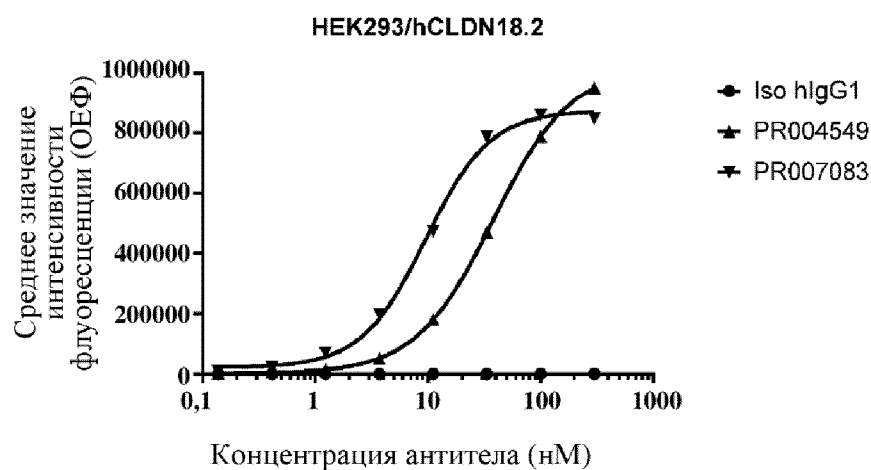
5a



5b



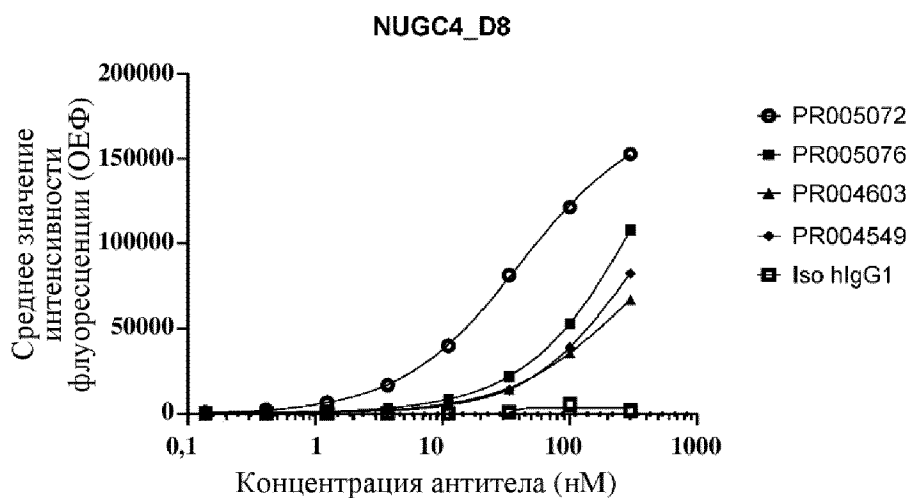
5c



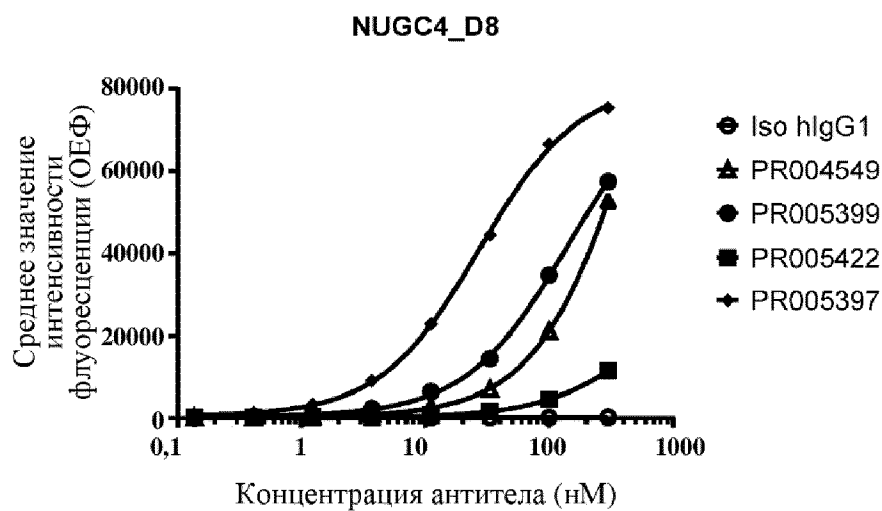
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей)

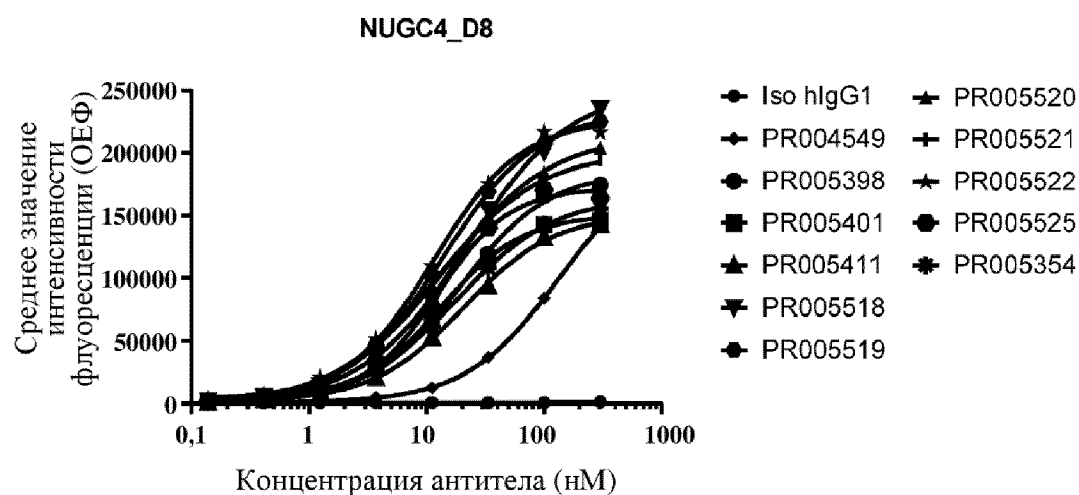
5d



5e



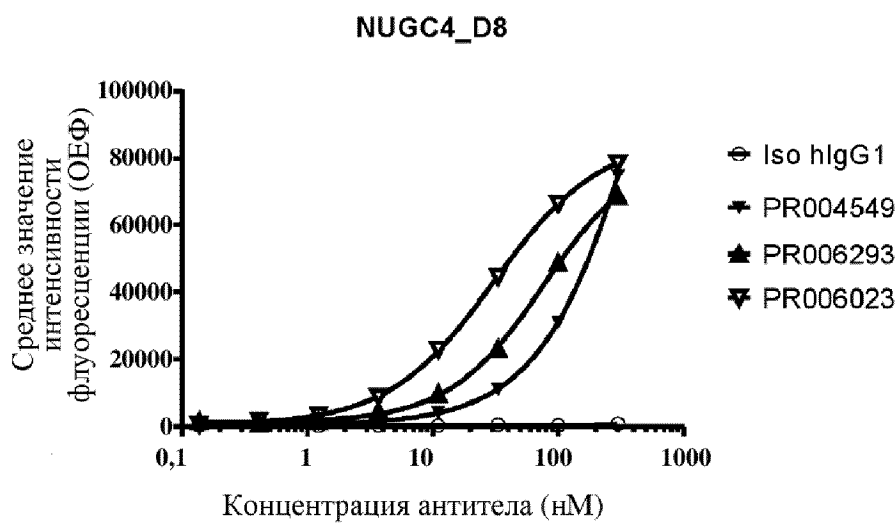
5f



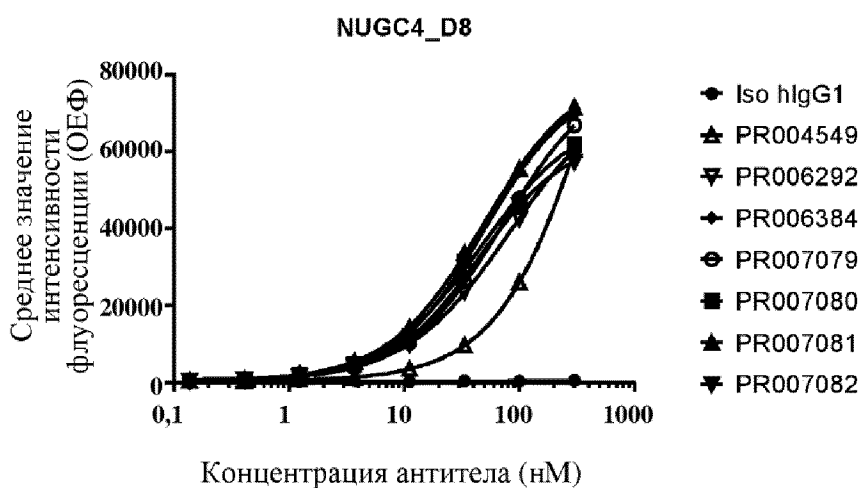
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

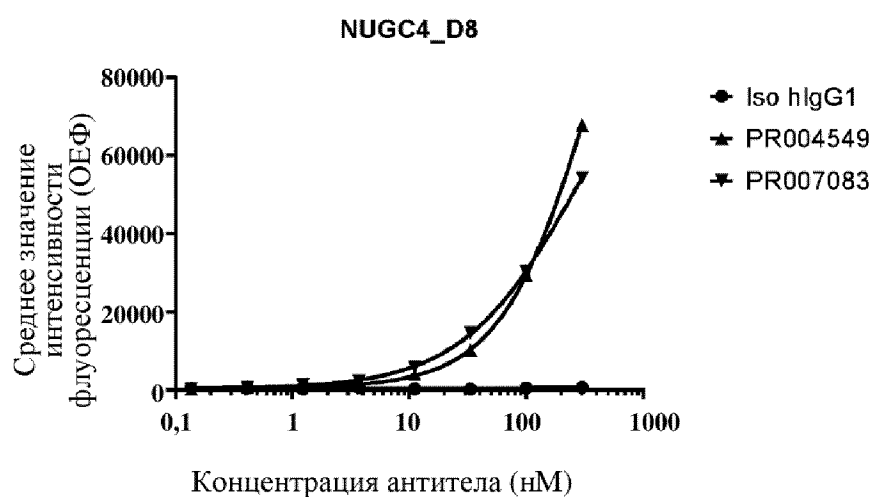
5g



5h

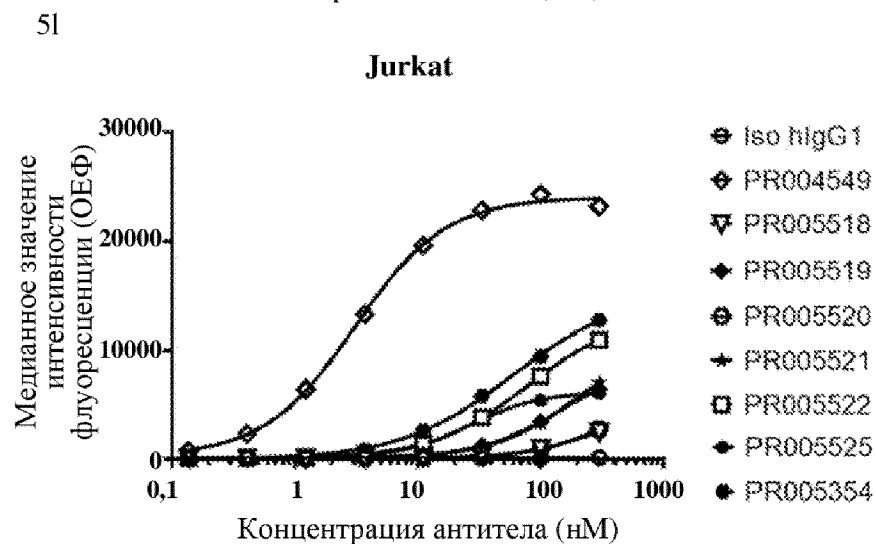
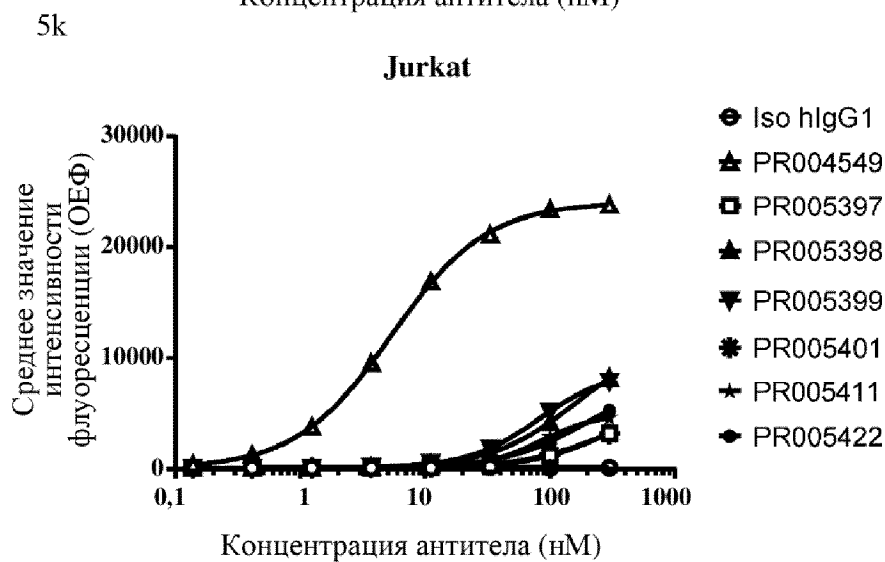
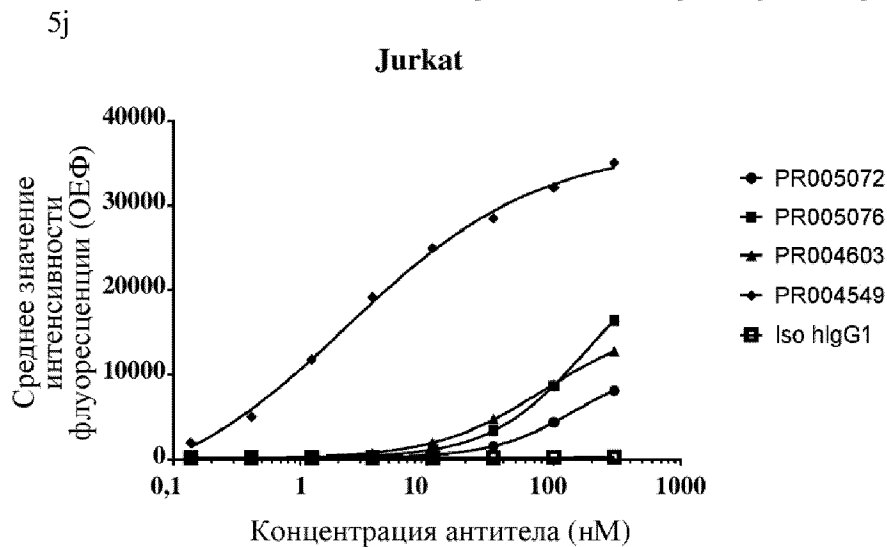


5i



(продолжение на следующей странице)

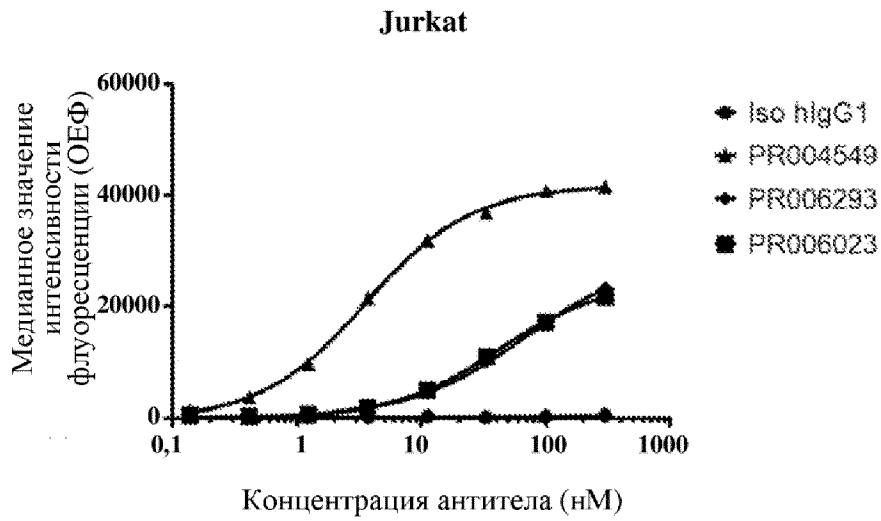
(продолжение с предыдущей страницы)



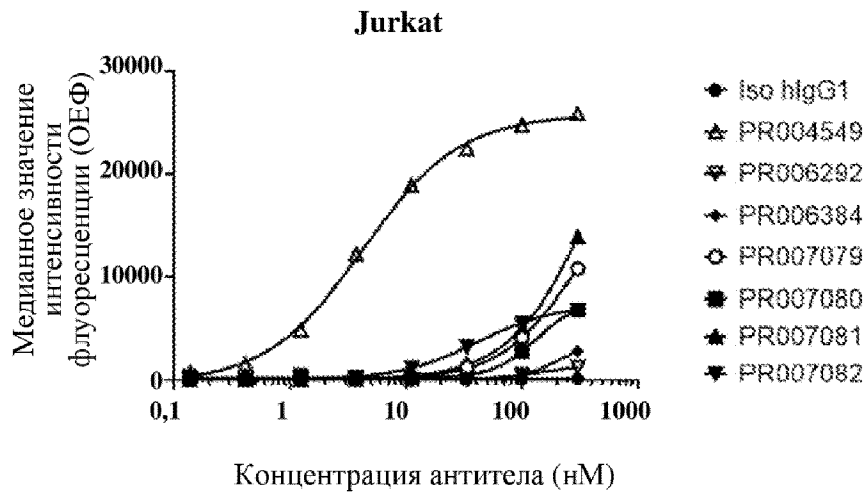
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

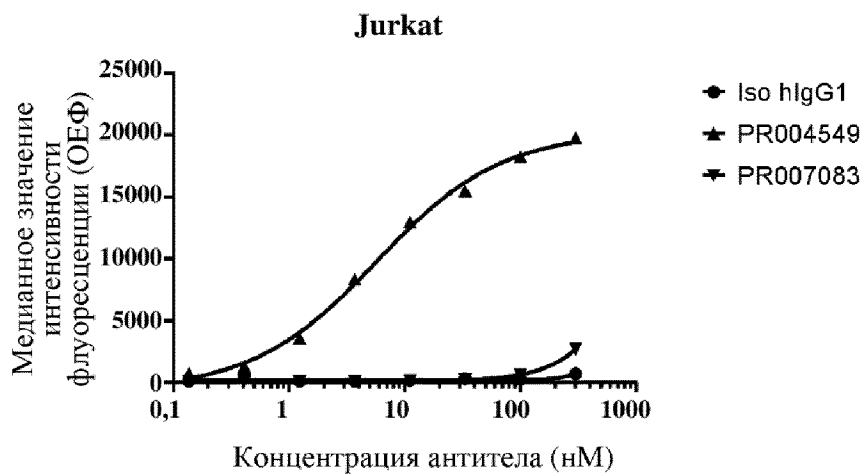
5m



5n



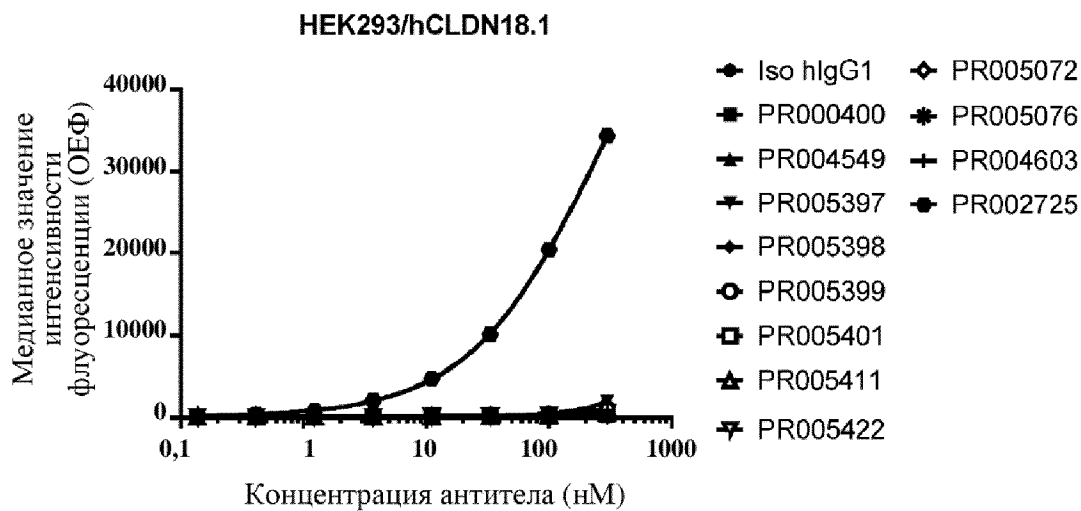
5o



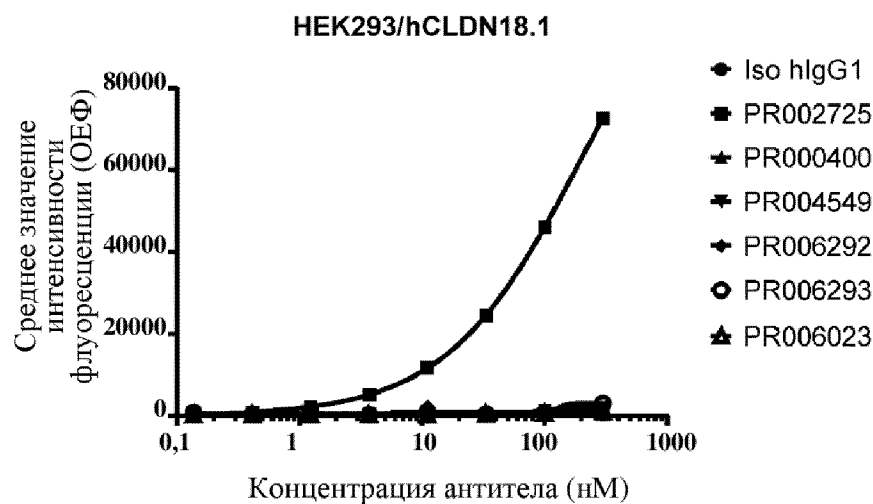
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

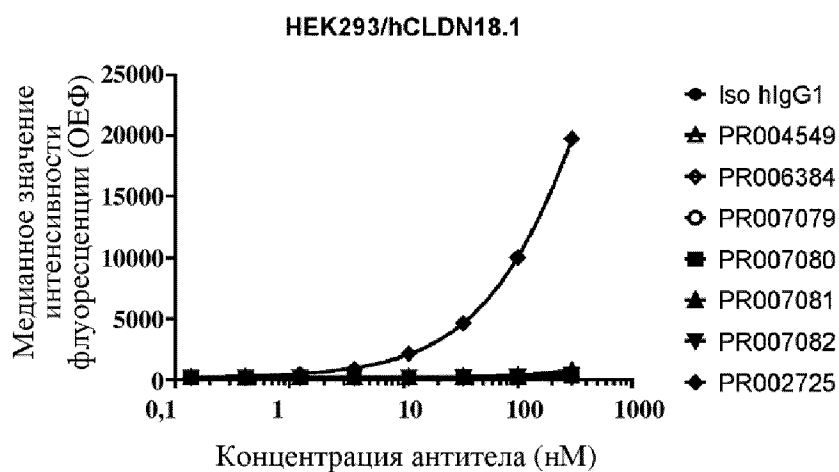
5p



5q



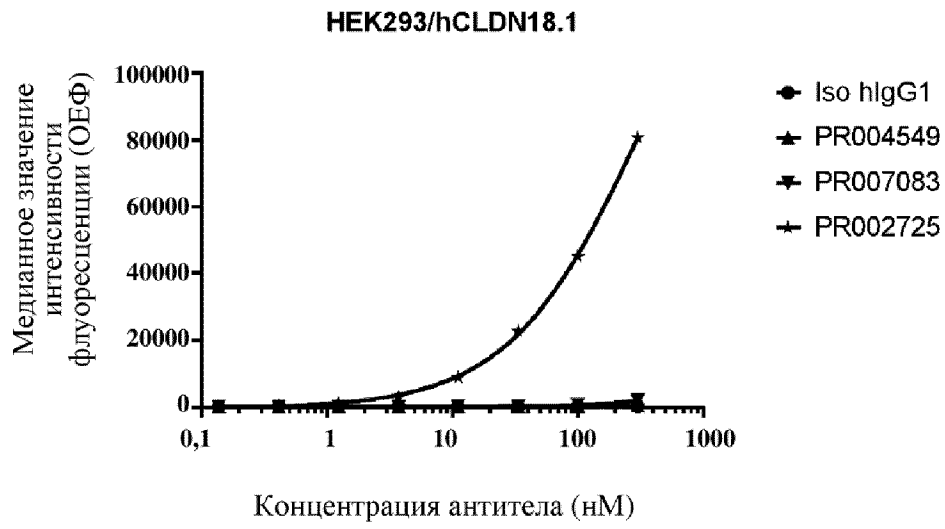
5r



(продолжение на следующей странице)

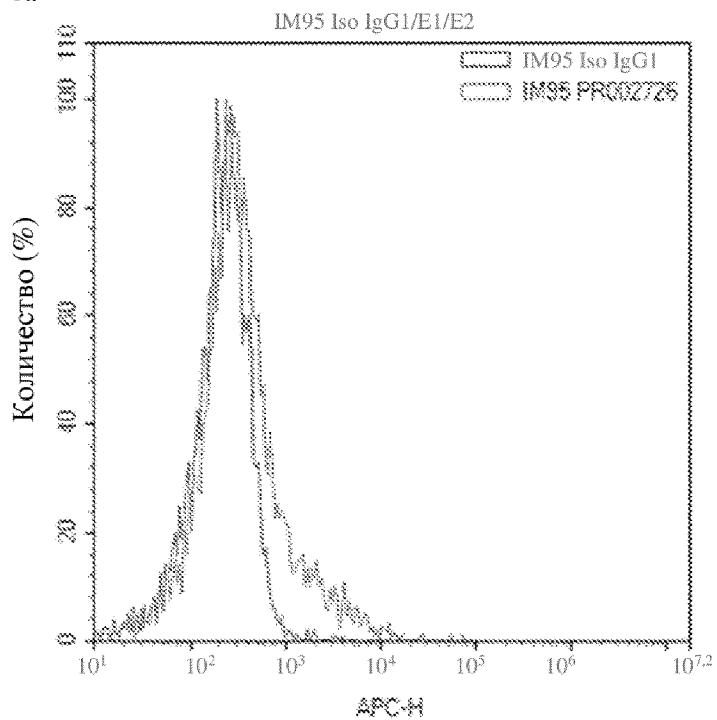
(продолжение с предыдущей страницы)

5s

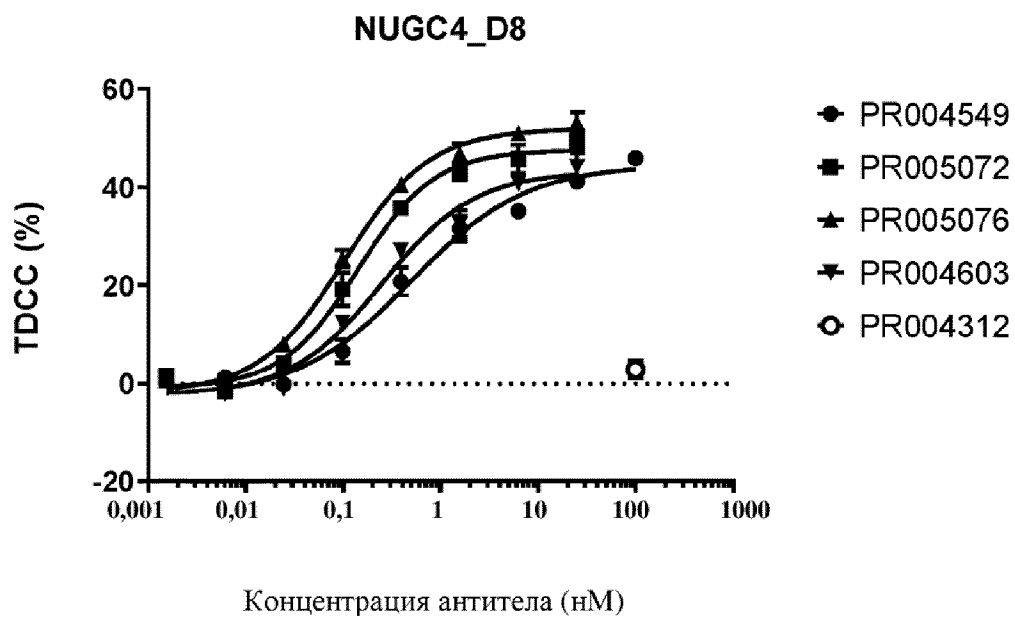


Фиг. 5

6a



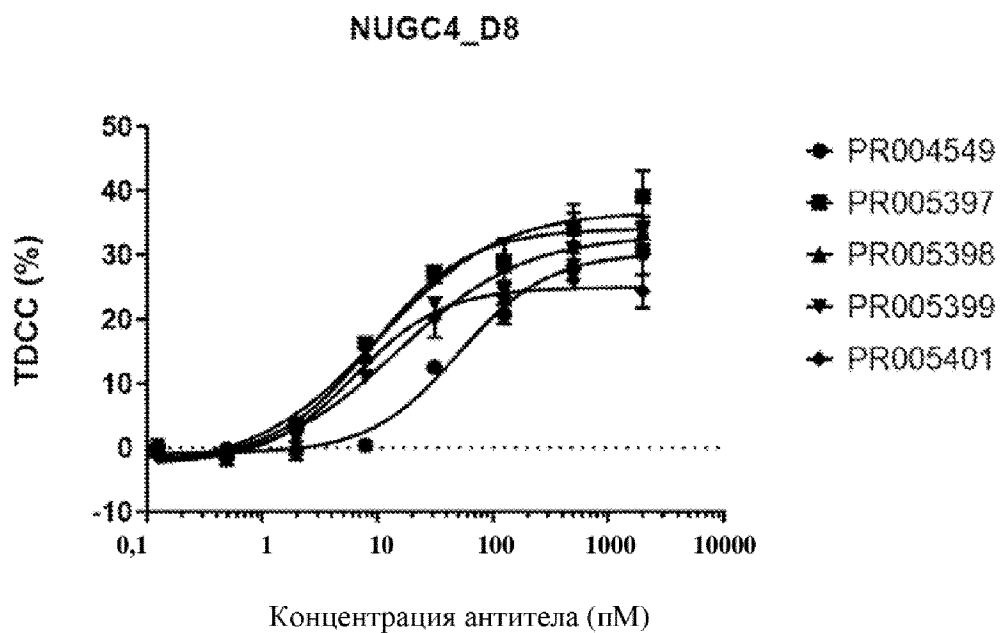
6b



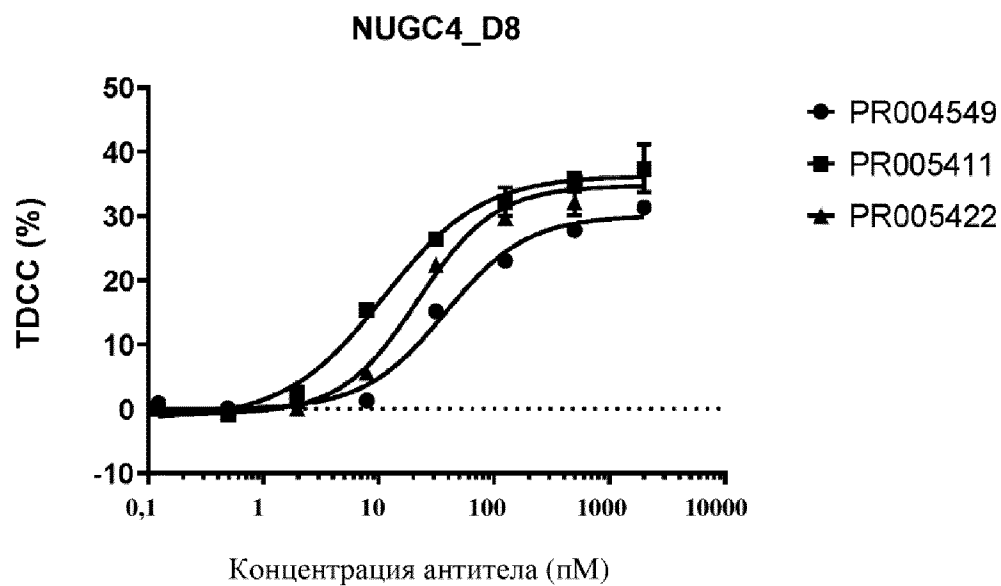
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6с



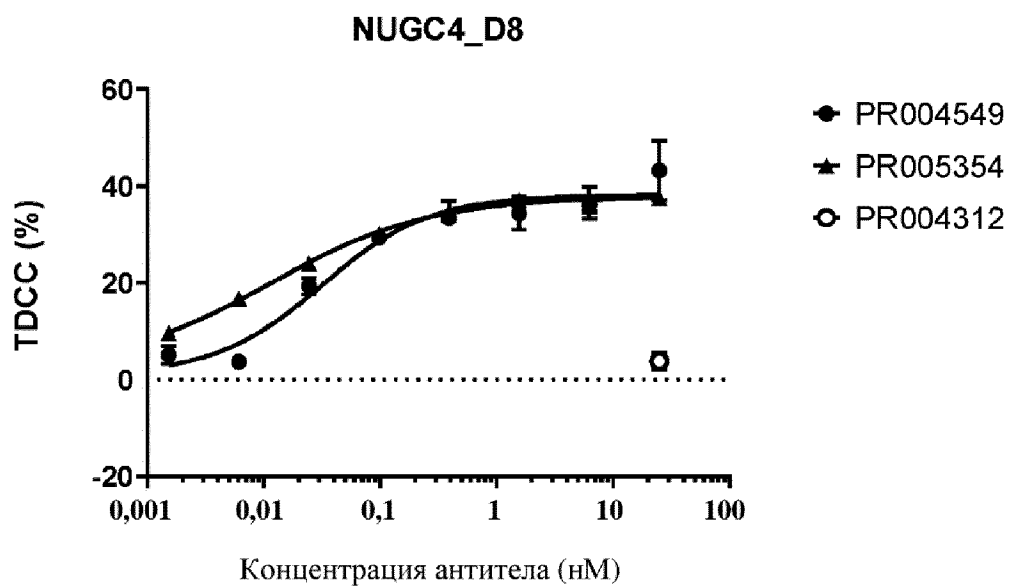
6d



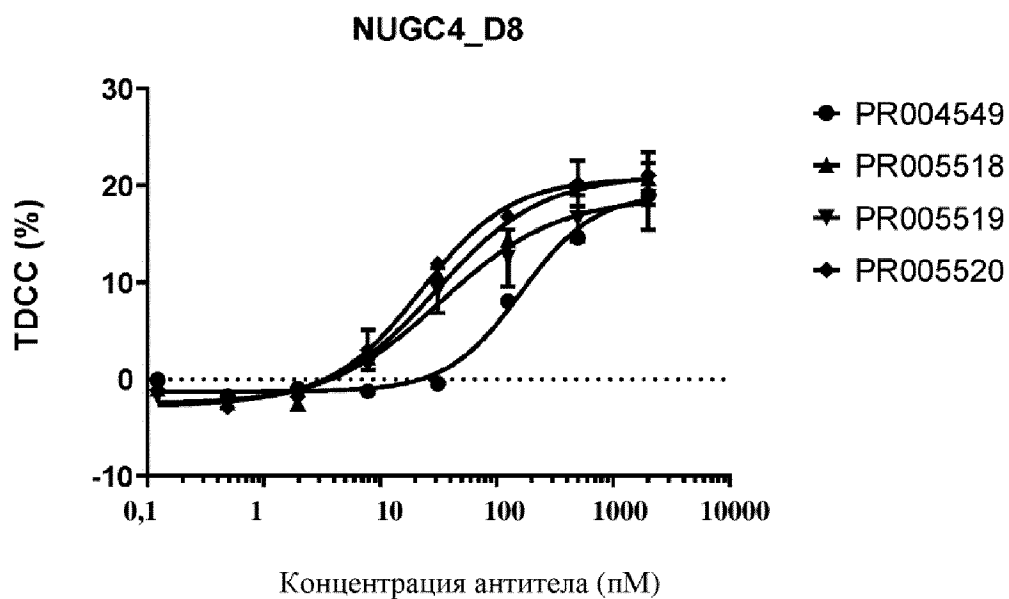
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6e



6f

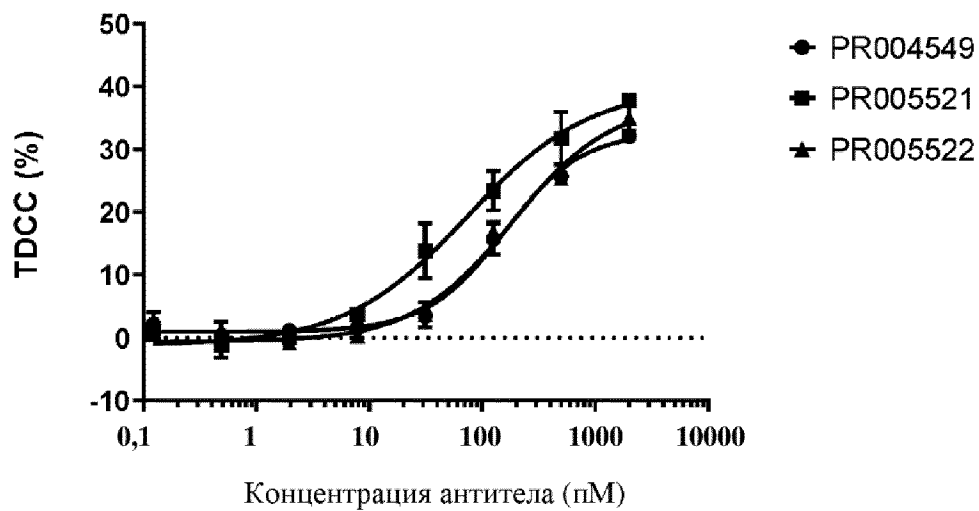


(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

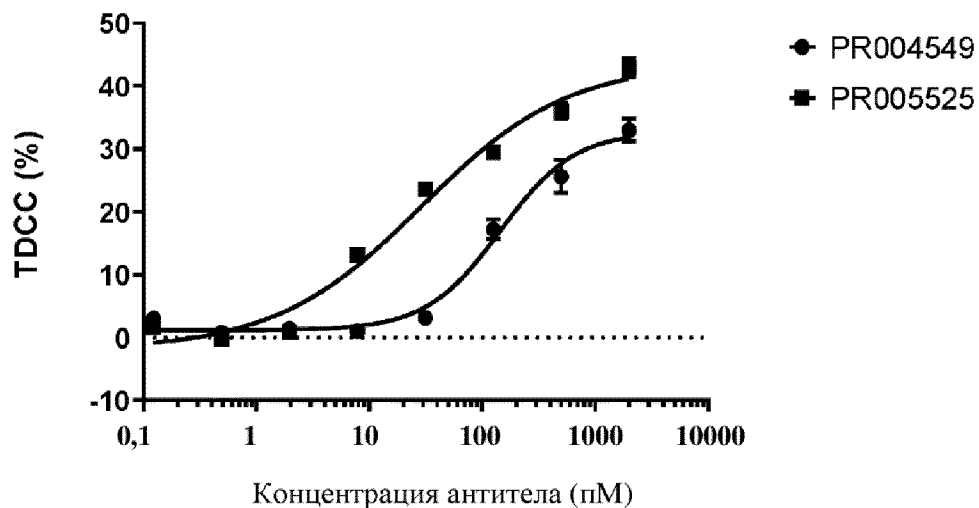
6g

NUGC4_D8



6h

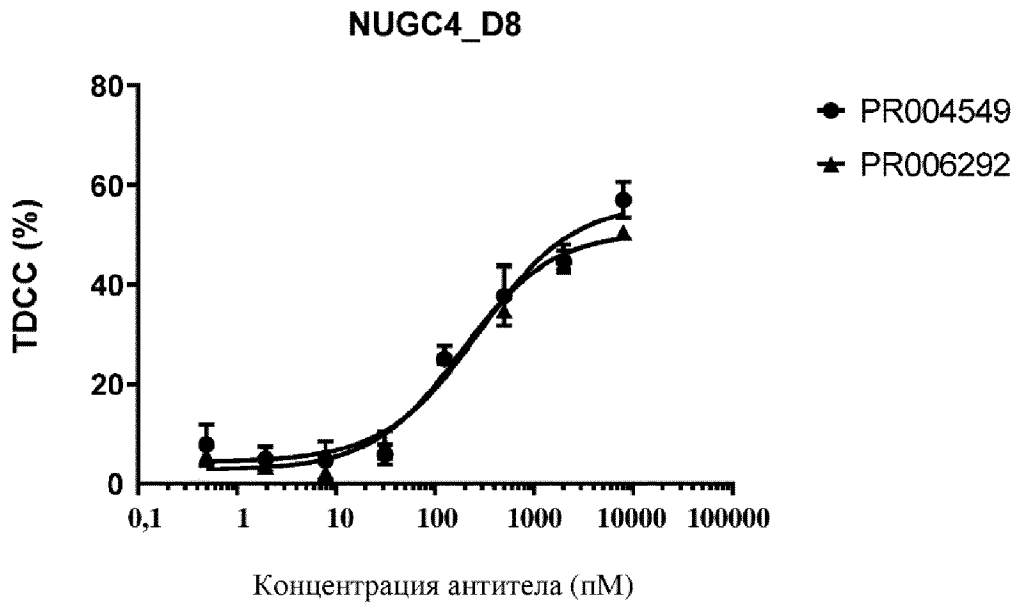
NUGC4_D8



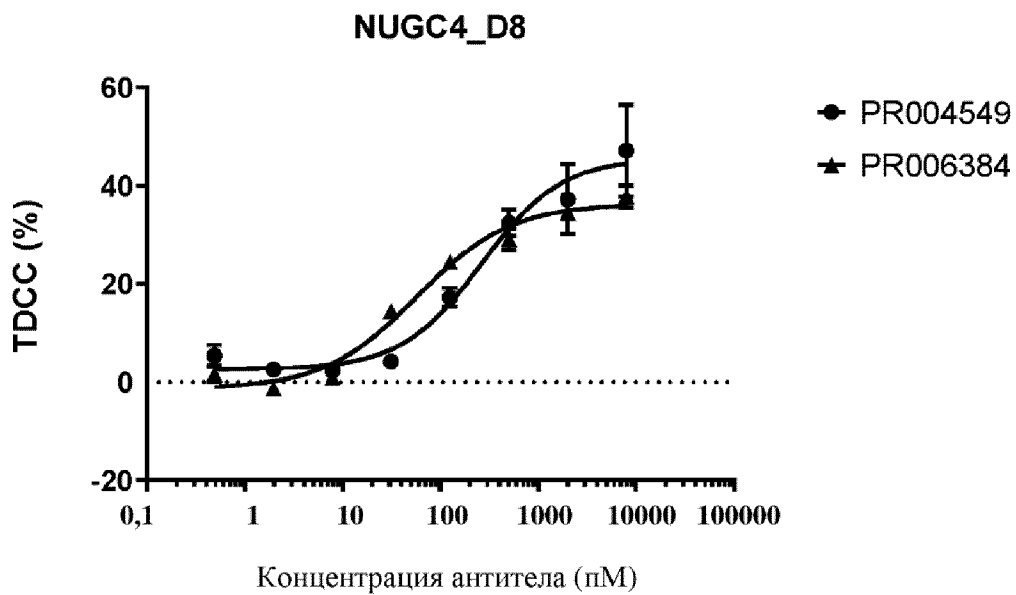
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6i



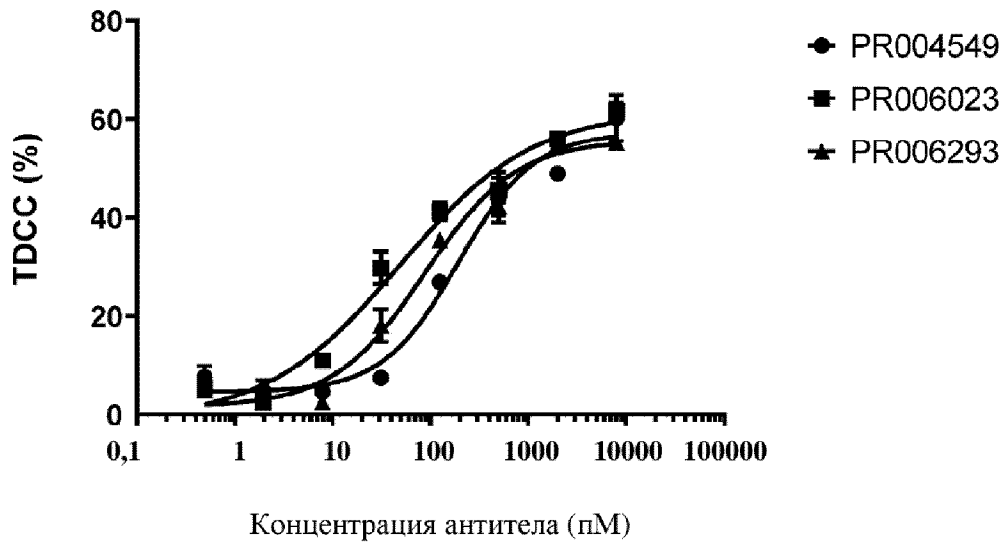
6j



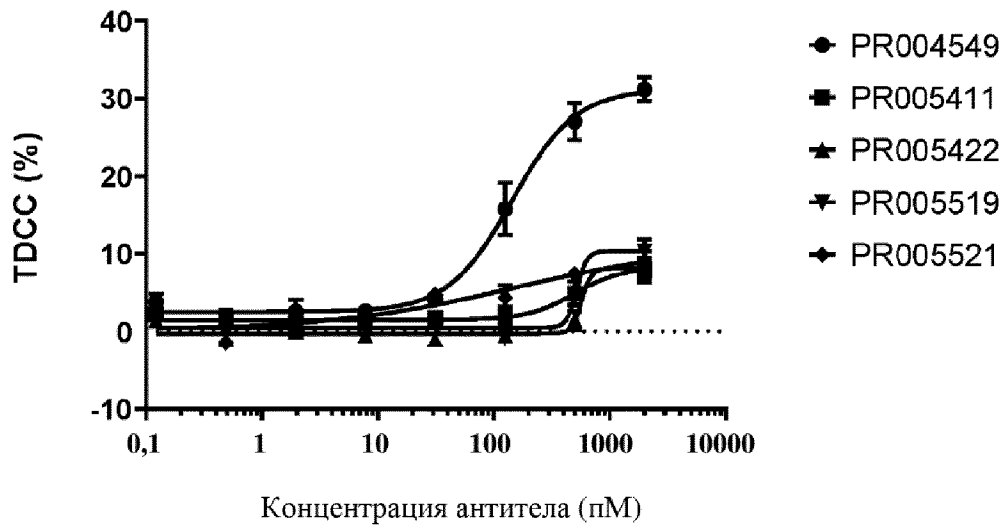
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6k

NUGC4_D8

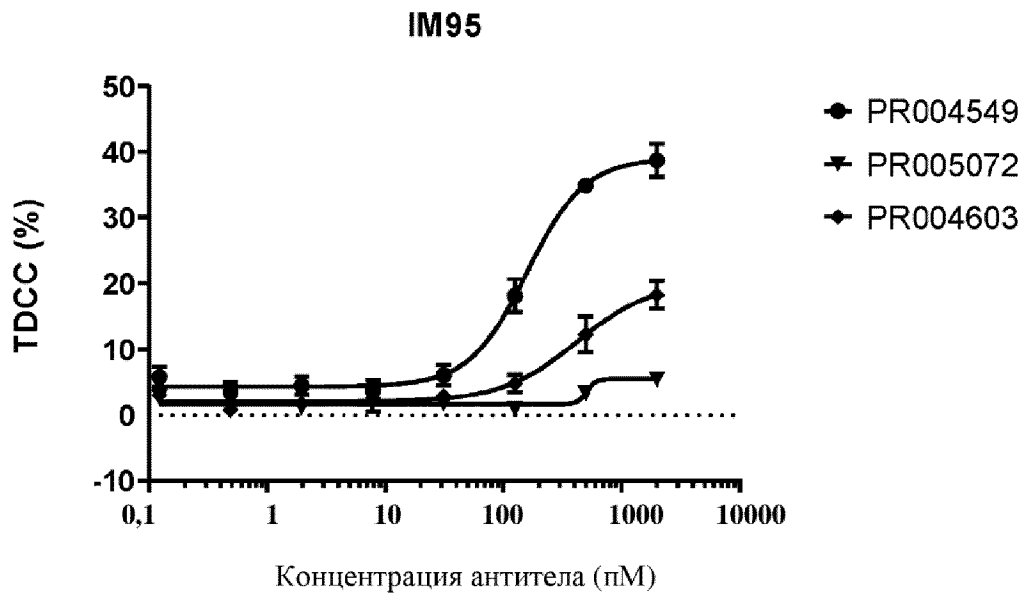
6l

IM95

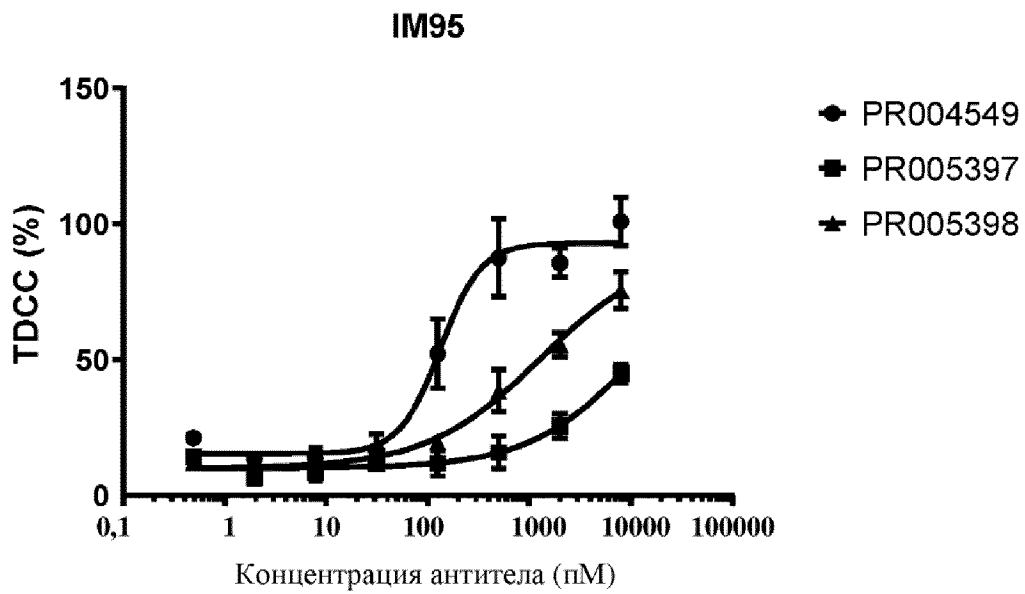
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6m



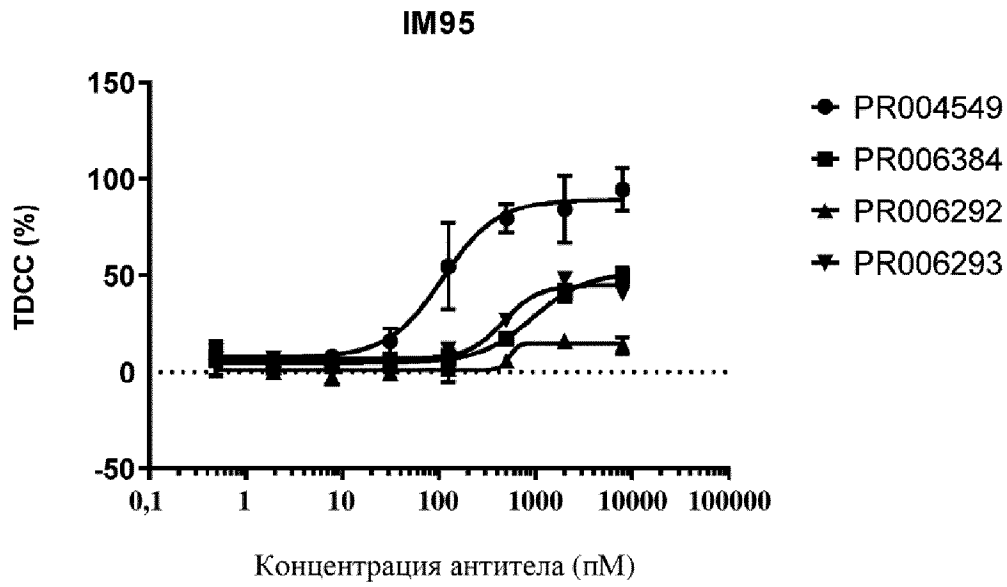
6n



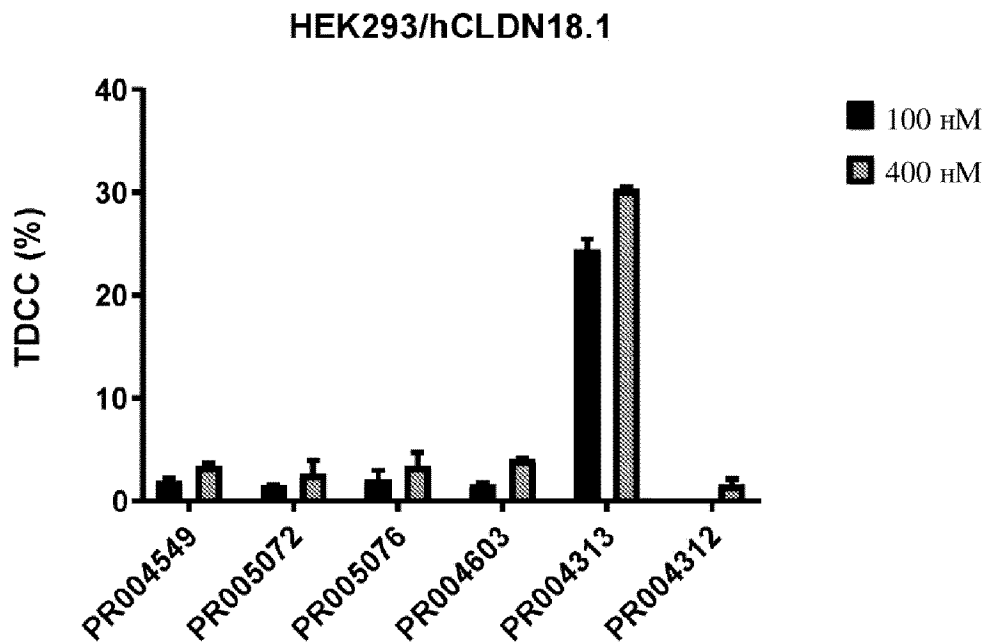
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

60



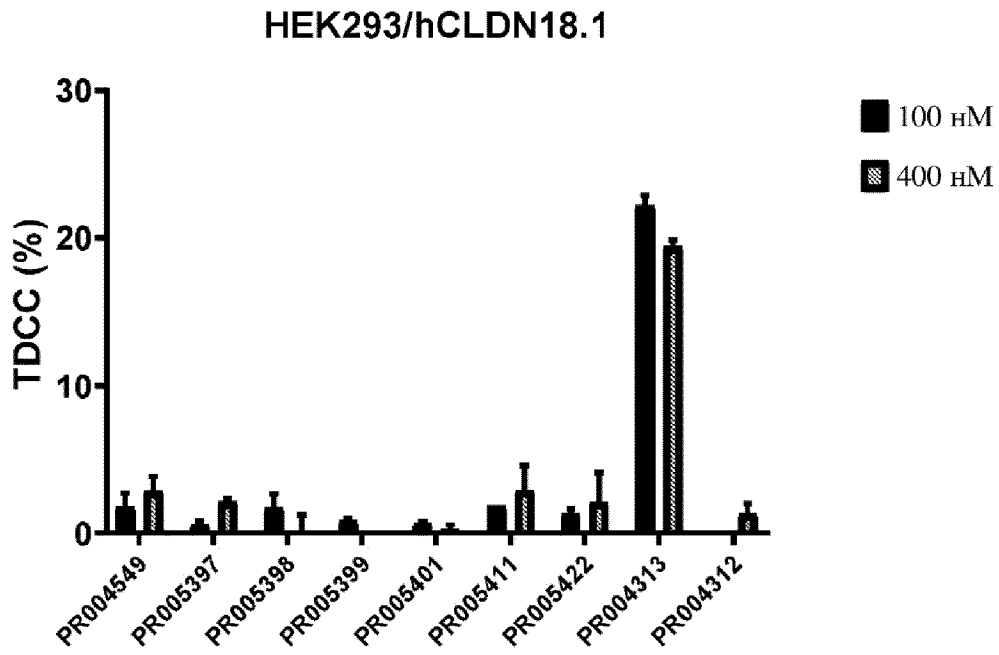
6p



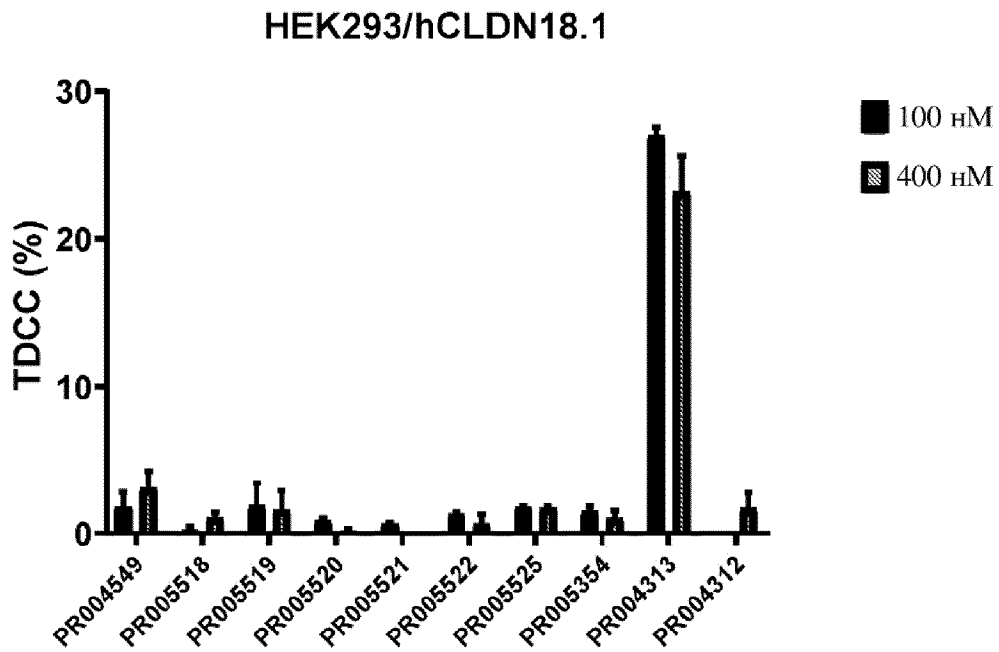
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6q



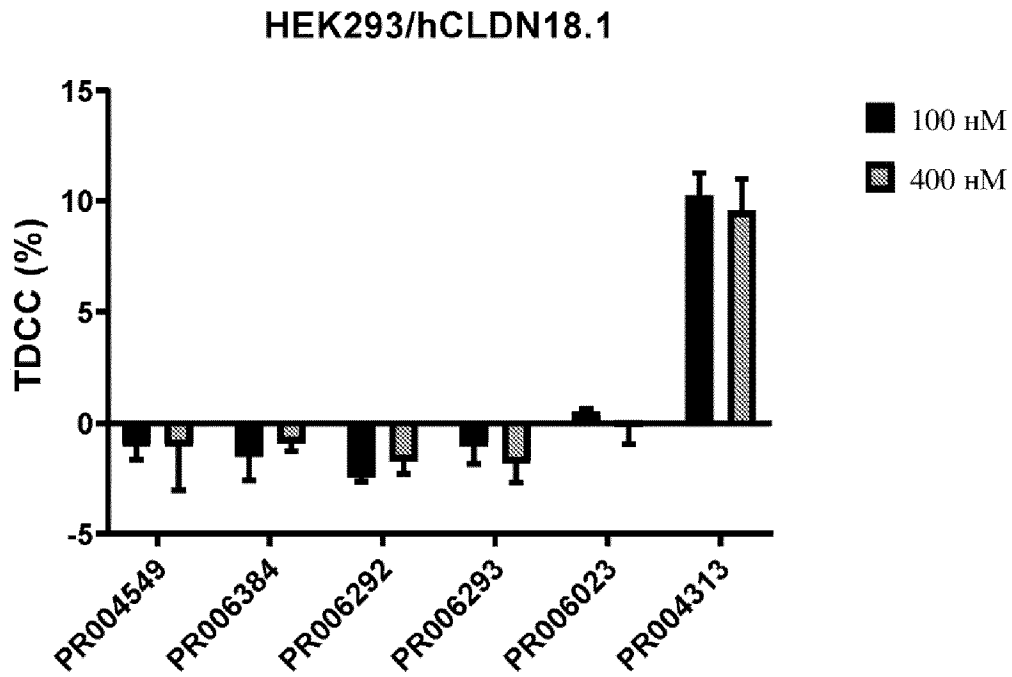
6r



(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6s



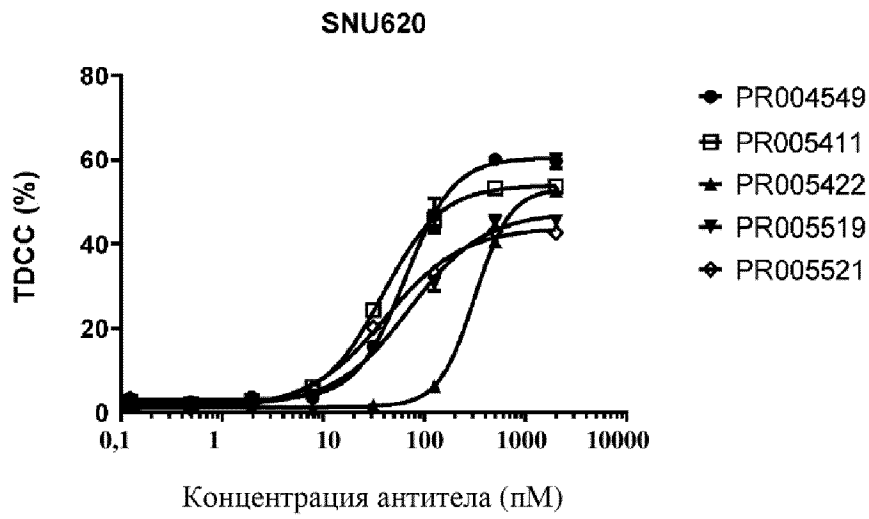
6t



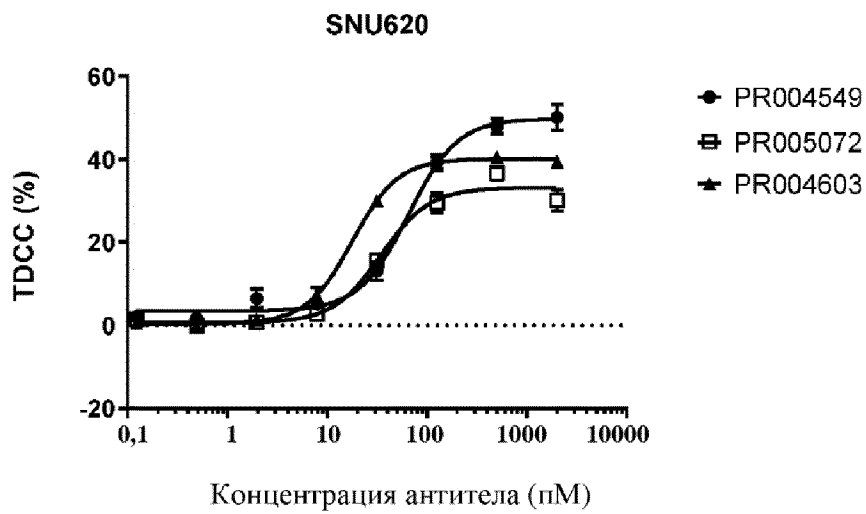
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6u



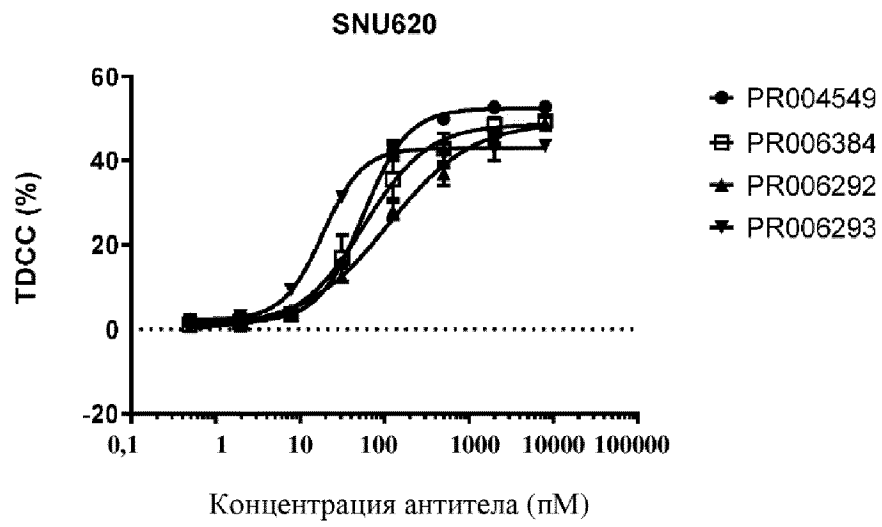
6v



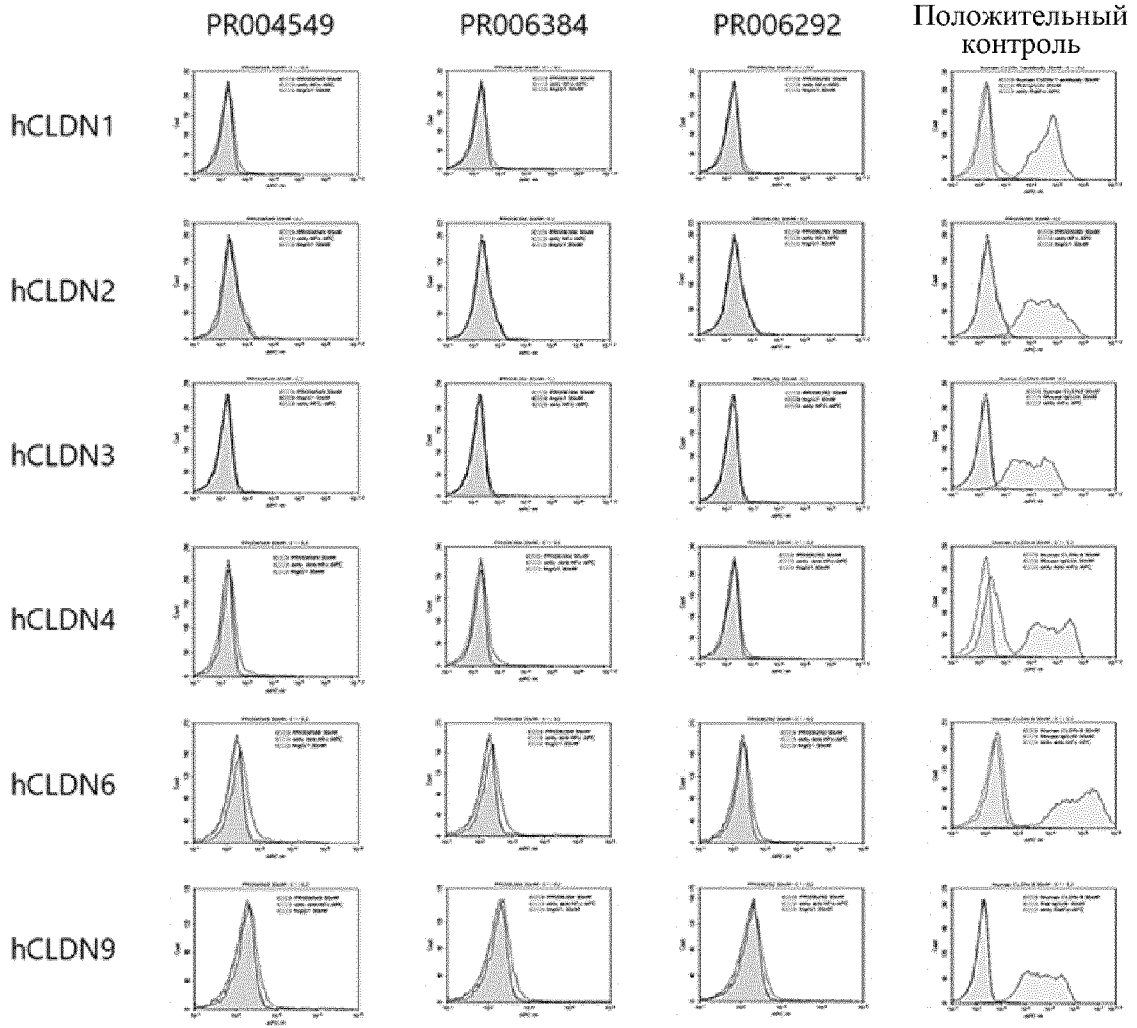
(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

6w

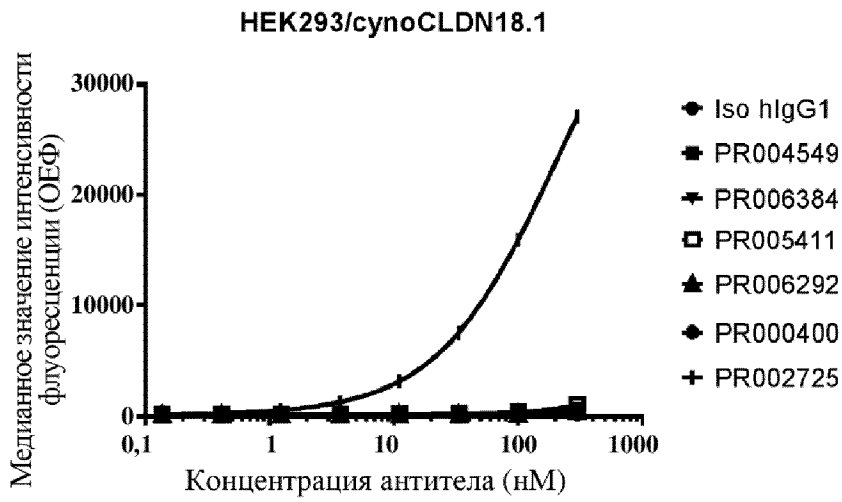


Фиг. 6

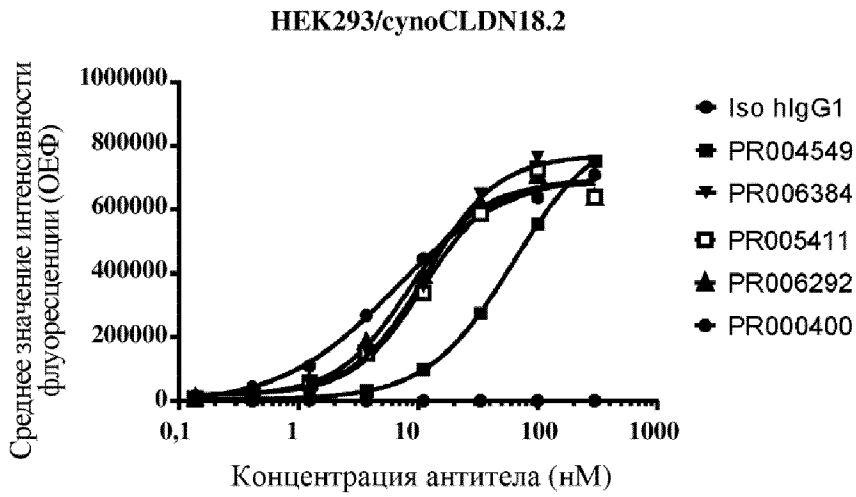


Фиг. 7

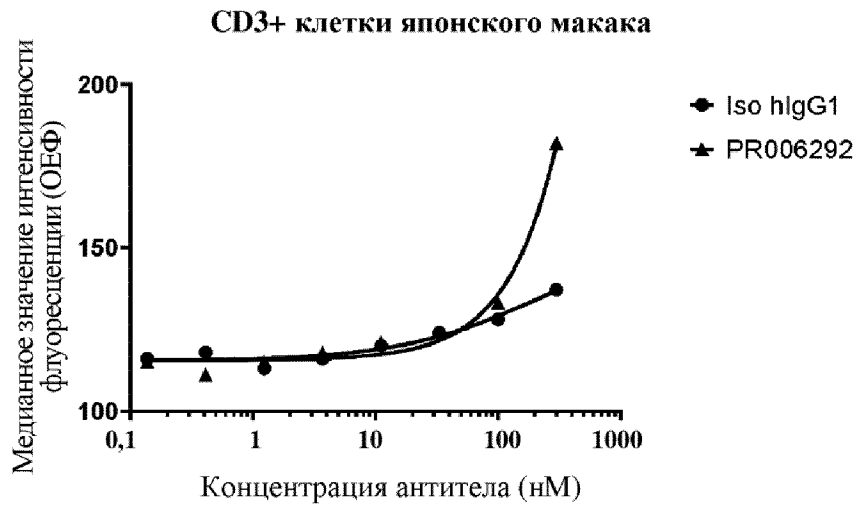
8a



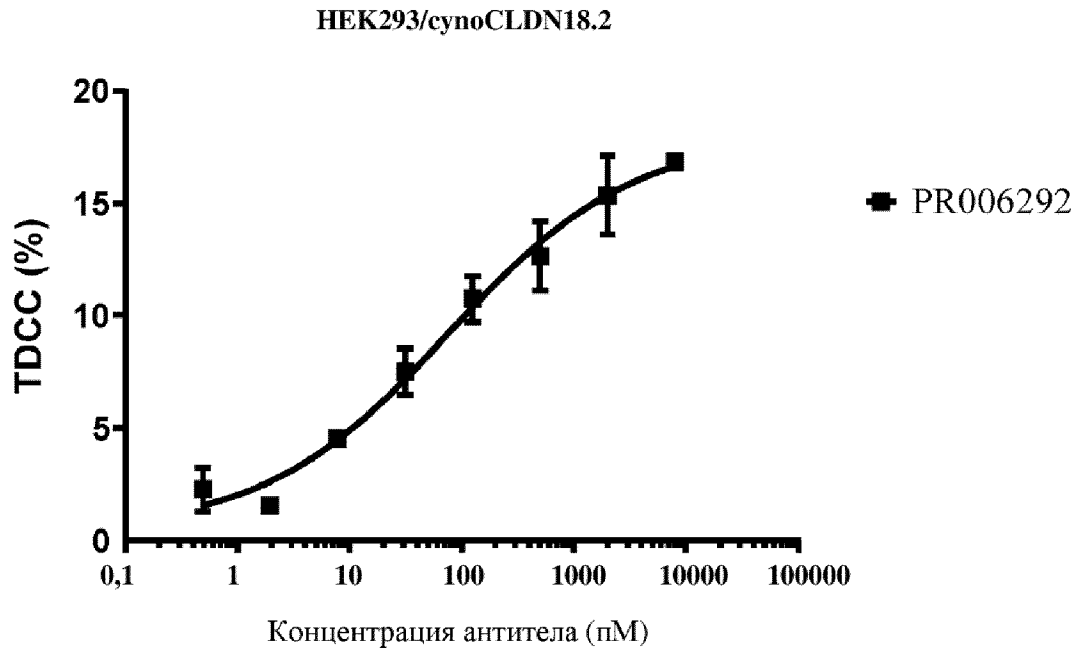
8b



8c

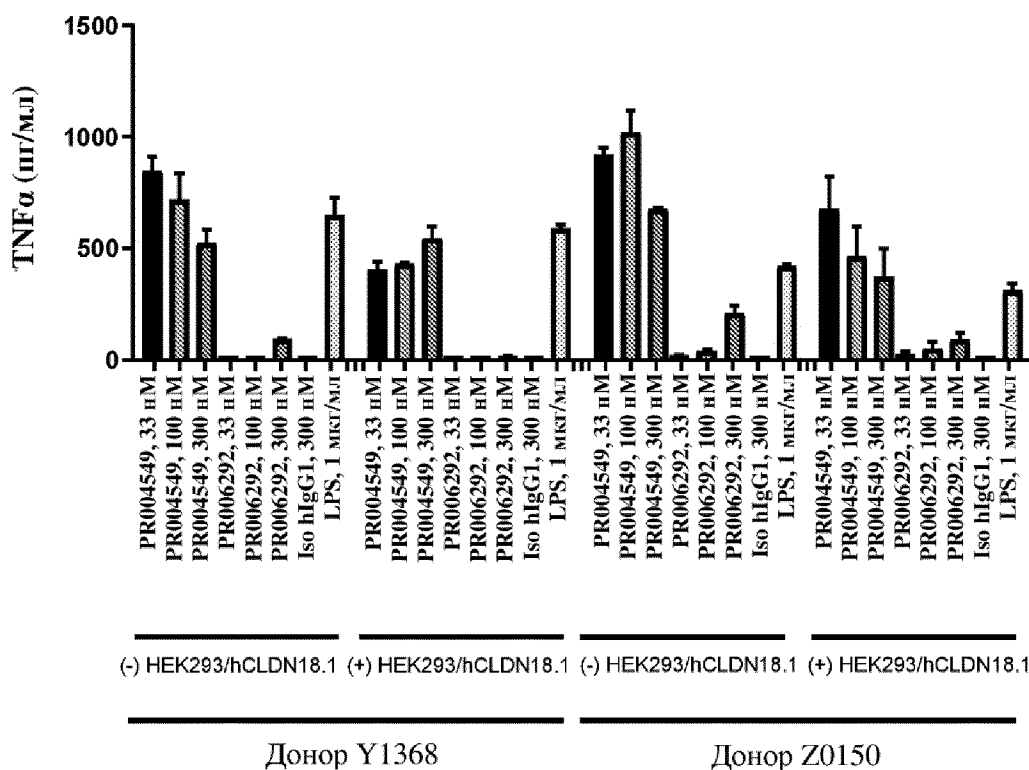


Фиг. 8

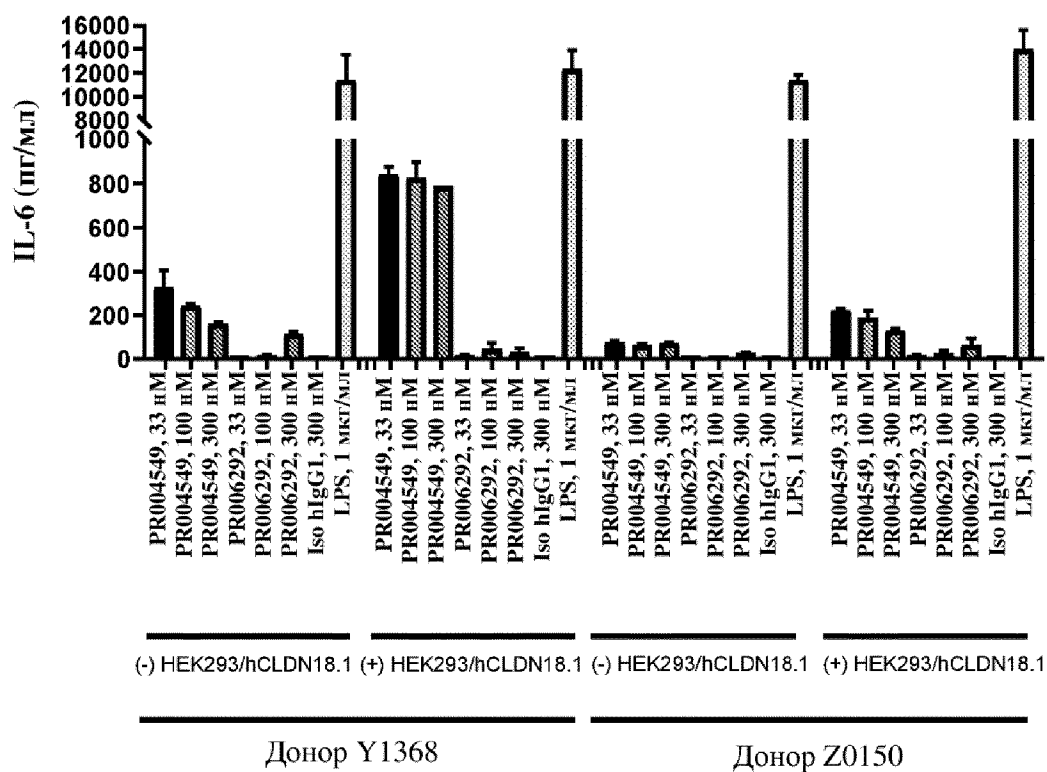


Фиг. 9

10a

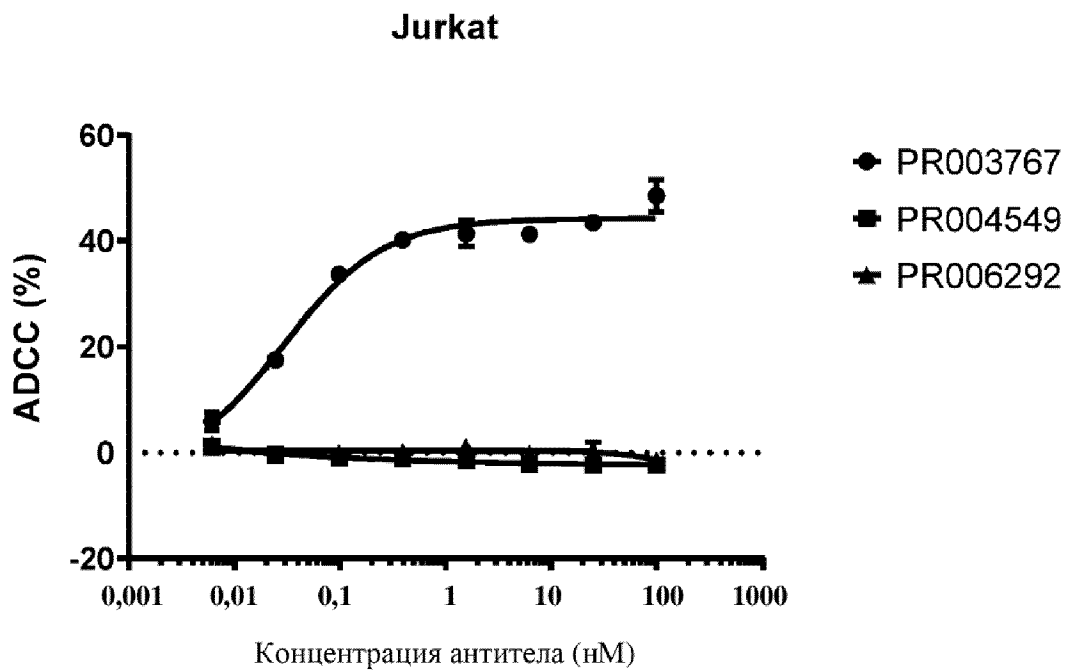


10b

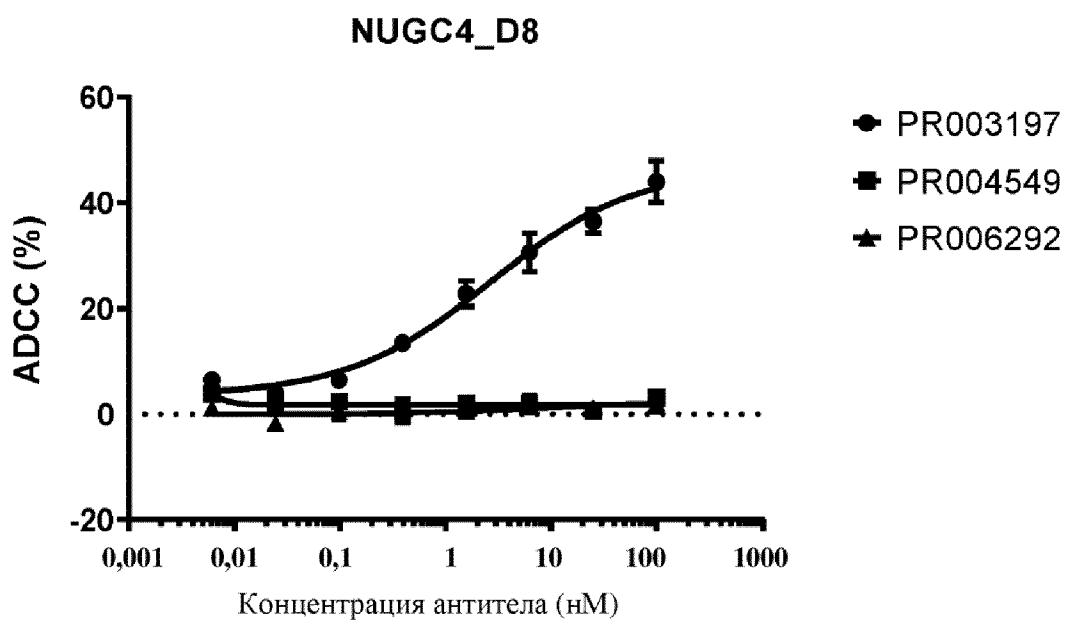


Фиг. 10

11a

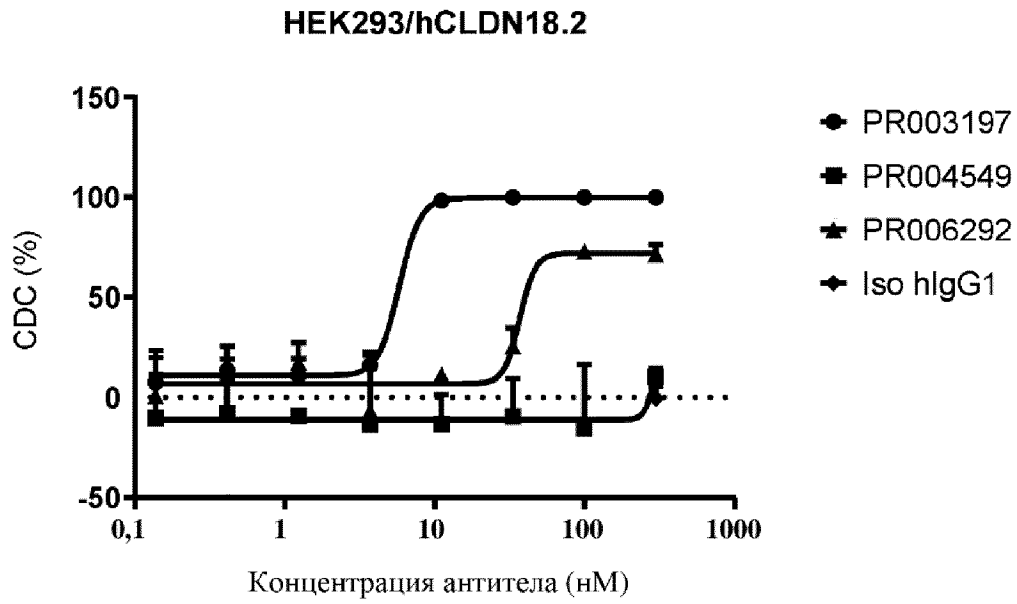


11b

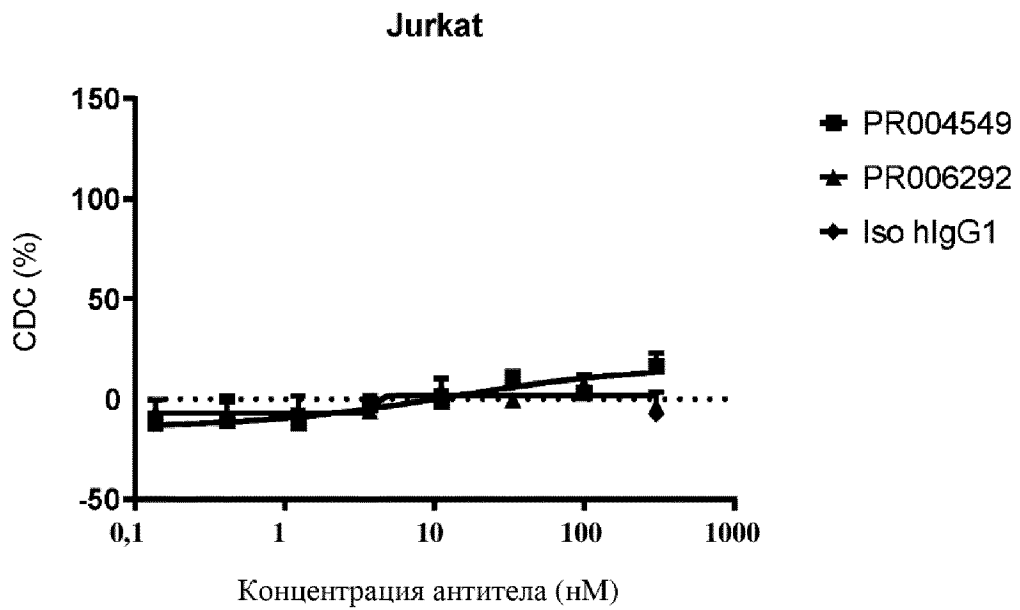


Фиг. 11

12a



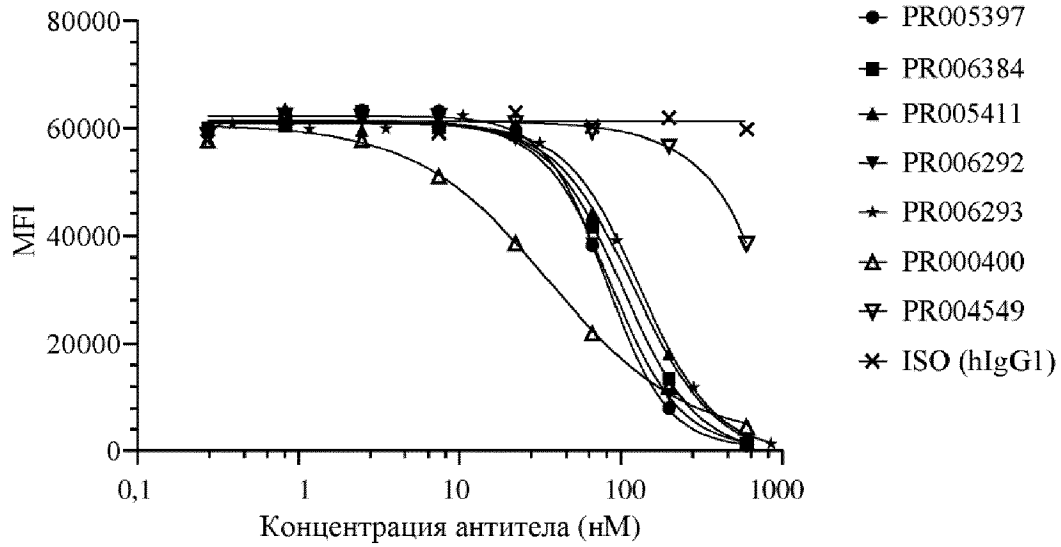
12b



Фиг. 12

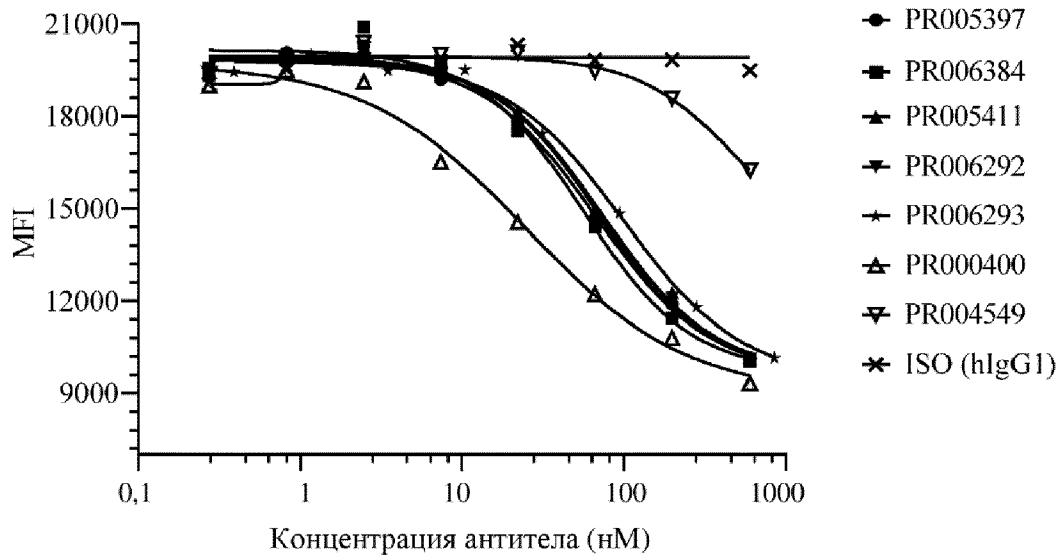
13a

Конкурентное связывание в присутствии
10 нМ биотинилированного PR000400

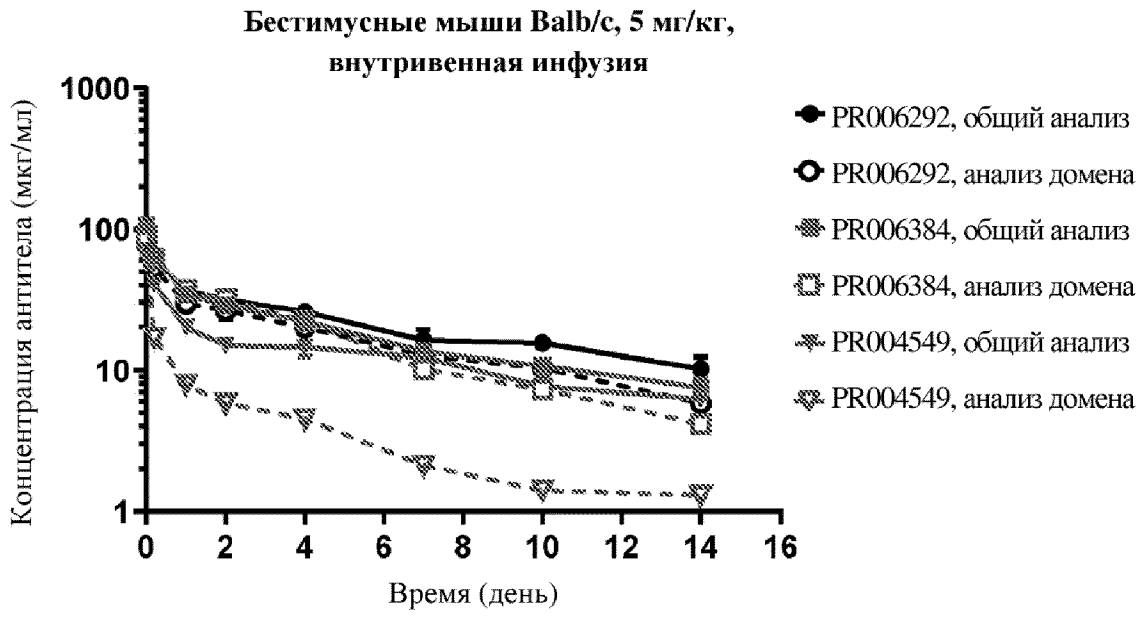


13b

Конкурентное связывание в присутствии
200 нМ биотинилированного PR004549



Фиг. 13

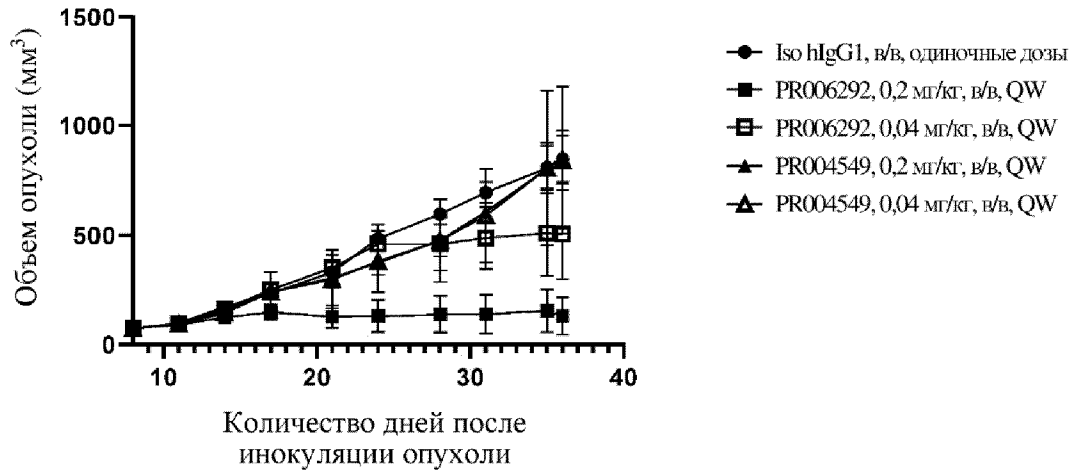


Фиг. 14

(продолжение с предыдущей страницы)

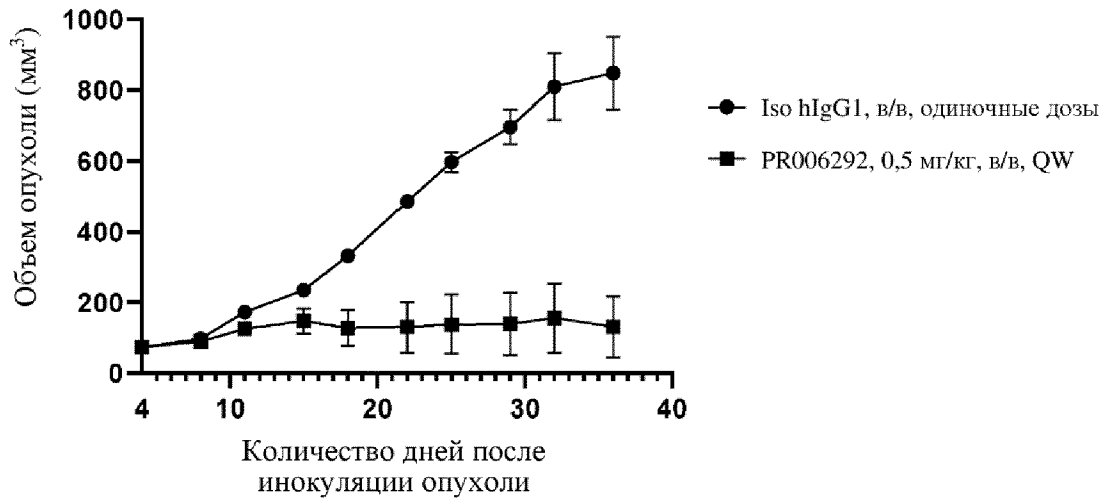
15c

Модель гуманизации SNU620 на PBMC



15d

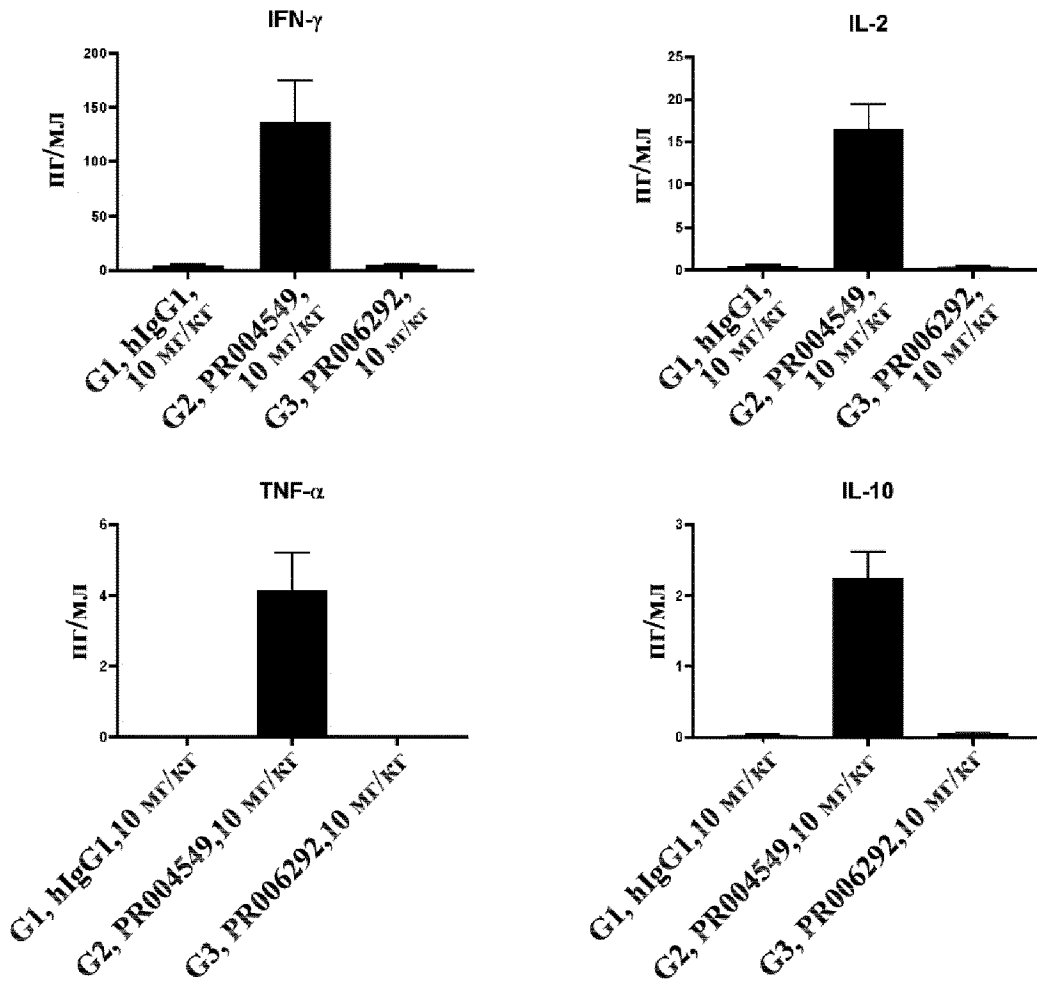
Модель гуманизации NuP-T4 на PBMC



(продолжение на следующей странице)

(продолжение с предыдущей страницы)

15e



Фиг. 15