(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190435 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.30

(22) Дата подачи заявки
2019.08.02

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ CLDN18.2 И CD3

(31) 62/714,366
(32) 2018.08.03
(33) US
(86) PCT/EP2019/070886
(87) WO 2020/025792 2020.02.06

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ (DE); ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дальхофф Кристоф, Блюмель Клаудиа, Брози Йоханнес, Раум Тобиас, Нарвольд Элизабет (DE), Арведсон Тара, Чэнь Ирвин, Росс Сандра, Бейлис Джули (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к конструкции на основе антитела, содержащей домен, который связывается с клаудином 18.2 (CLDN18.2), и другой домен, который связывается с CD3. Более того, в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий конструкцию на основе антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в настоящем изобретение предусмотрен способ получения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, применение указанной конструкции на основе антитела в медицине и набор, содержащий указанную конструкцию на основе антитела.

202190435 A1

202190435 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–566887EA/045

КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ CLDN18.2 И CD3

Настоящее изобретение относится к конструкции на основе антитела, содержащей домен, который связывается с клаудином 18.2 (CLDN18.2), и другой домен, который связывается с CD3. Более того, в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий конструкцию на основе антитела, вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная указанным полинуклеотидом или вектором. Кроме того, в настоящем изобретение предусмотрен способ получения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, применение указанной конструкции на основе антитела в медицине и набор, содержащий указанную конструкцию на основе антитела.

Предпосылки изобретения

Клаудины являются ключевыми структурными и функциональными компонентами плотных контактов эпителия, функцией которые является регуляция проницаемости между клетками, поддержание гомеостаза ионов и обеспечение клеточной адгезию и полярности. Клаудины представляют собой четырехпроходные трансмембранные белки массой 22-27 кДа, которые мультимеризуются в пределах или вдоль клеточных мембран, образуя защитный барьер. Сообщалось о 24 белках-клаудинах, которые отличаются специфичностью своей локализации в тканях и своим взаимодействием с другими белками.

Клаудин-18 (CLDN18) первоначально был идентифицирован как ген-мишень для фактора транскрипции T/EBP/NKX2.1. В соответствии с его гомологией с другими представителями семейства клаудинов, было подтверждено, что CLDN18 локализуется в плотных клеточных контактах у мыши и человека. Было показано, что CLDN18 кодирует две изоформы, образуемые за счет альтернативного сплайсинга: CLDN18.1, специфически экспрессируемую в нормальной ткани легкого, и CLDN18.2, экспрессируемую в дифференцированных клетках слизистой оболочки желудка.

CLDN18.2 представляет собой белок из 261 аминокислоты с двумя внеклеточными петлями, и он характеризуется 92% идентичностью последовательности с CLDN18.1. Первая внеклеточная петля CLDN18.2, в отличие от второй внеклеточной петли, характеризуется восемью аминокислотными отличиями от CLDN18.1. Гомология CLDN18.2 с другими представителями семейства более ограничена, при этом общая идентичность с CLDN1, CLDN6 и CLDN7 составляет 29-34%.

CLDN18.2 экспрессируется на нескольких типах опухолей, включая рак желудка, рак поджелудочной железы, рак пищевода, муцинозный рак яичника и немелкоклеточный рак легкого. Экспрессия CLDN18.2 на раке желудка включает инвазивный фронт и метастатические участки, хотя, как сообщается, абсолютные уровни CLDN18 в этих условиях снижаются. Экспрессия CLDN18.2 на многих типах опухолей, с учетом того, что нормальная тканевая экспрессия в основном ограничена дифференцированными клетками желудка, привела к рассмотрению CLDN18.2 в качестве терапевтической мишени при раке желудка и других показаниях.

Рак желудка и гастроэзофагеальный рак остаются показаниями с высокой неудовлетворенной медицинской потребностью,:при этом ежегодно во всем мире регистрируется по меньшей мере 1,4 миллиона новых случаев и 1,1 миллиона случаев смерти (Lordick and Janjigian, Nat Rev Cancer 2016). Типичное лечение первой линии включает хирургическое вмешательство и комбинированную химиотерапию, которая включает соединения платины и фторпиримидина. Хотя данная схема потенциально может улучшить качество жизни и продлить выживаемость в среднем на 8-10 месяцев, 5-летняя выживаемость остается низкой.

Альтернативную стратегию лечения предлагают виды таргетной терапии. Моноклональное антитело к Her2, трастузумаб, одобрено в качестве терапии первой линии для Her2-положительного рака желудка и гастроэзофагеального рака в комбинации с химиотерапией (Bang et al., The Lancet 2010). Антитело к VEGFR2, рамуцирумаб, одобрено для лечения рака желудка и гастроэзофагеального рака, которые прогрессируют после химиотерапии (Fuchs et al., The Lancet 2014). Хотя данные средства направленного действия дополнительно увеличивают выживаемость по сравнению с только химиотерапией, их эффективность была ограничена гетерогенностью экспрессии мишени и механизмами устойчивости.

В последнее время терапия, направленная на иммунные контрольные точки, в отдельных условиях продемонстрировала активность: пембролизумаб был одобрен в Соединенных Штатах Америки для лечения опухолей с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H), включая рак желудка (Le et al., Science 2017), и для лечения неоперабельного некурабельного или рецидивирующего рака желудка, который прогрессировал после двух или более линий химиотерапии (Fuchs et al., J Clin Oncol 2017). Ниволумаб был одобрен в Японии для лечения неоперабельного некурабельного или рецидивирующего рака желудка, который прогрессировал после химиотерапии (Kang et al., The Lancet, 2017). Только 1-2% пациентов в неселектированных популяциях и 60% в популяции с MSI-H (высокая микросателлитная нестабильность) (9% от общего числа случаев рака желудка и гастроэзофагеального рака) продемонстрировали полный ответ в данных исследованиях. Следовательно, все еще необходимы новые виды терапии, способные обеспечить устойчивый ответ у большей популяции пациентов.

Было доказано, что рак поджелудочной железы в меньшей степени поддается доступной терапии, чем рак желудка или гастроэзофагеальный рак. Ежегодно во всем мире регистрируется по меньшей мере 338000 случаев и 331000 смертей от рака поджелудочной железы, а средняя выживаемость составляет 6 месяцев (Ilic and Ilic, World J Gastroenterol 2016). Только 20-30% пациентов являются кандидатами на хирургическую резекцию. Гемцитабин рассматривали в качестве терапии первой линии до недавнего времени, когда было показано, что комбинированные схемы химиотерапии FOLFIRINOX (5-фторурацил, лейковорин, оксалиплатин, иринотекан) и гемцитабин с набпаклитакселом увеличивают общую выживаемость на ~2-5 месяцев по сравнению с лечением только гемцитабином(Uccello et al., Curr Oncol 2018). Другие виды комбинированной химиотерапии обычно используются в качестве терапии второй линии. Некоторые средства направленной терапии и иммунотерапии оценивали как средства с ограниченным успехом при некурабельном раке поджелудочной железы. Опухоли поджелудочной железы характеризуются десмоплазией и иммуносупрессорными иммунными инфильтратами, которые обуславливают данное отсутствие ответа. Необходимы новые виды терапии, способные преодолеть данное иммуносупрессорное окружение и увеличить выживаемость.

Конструкции на основе биспецифических антител, содержащие один домен, который связывается с CD3 на Т-клетке, и один домен, который связывается с белком, экспрессируемым на клетке-мишени, непосредственно соединяют Т-клетки с клетками-мишенями для индукции перенаправленного лизиса под действием Т-клеток. Данный механизм действия отличается от химиотерапии, таргетной терапии и других типов иммунотерапии тем, что он может работать с любыми CD3-положительными Т-клетками, независимо от костимулирующего активирующего сигнала (Klinger et al., Immunol Reviews 2016). Экспрессия CLDN18.2 на поверхности клеток рака желудка, гастроэзофагеального рака и рака поджелудочной железы обеспечивает основу для нацеливания на эти типы опухолей с помощью конструкции на основе антитела к CLDN18.2 x CD3. Более того, конструкция на основе антитела к CLDN18.2 x CD3 способна нацеливаться на дополнительные типы опухолей, которые экспрессируют CLDN18.2, включая муцинозный рак яичника, колоректальный рак и немелкоклеточный рак легкого.

Подробное описание изобретения

Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения представлена конструкция на основе антитела, содержащая первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки.

Также предполагается, что:

(1) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с первой внеклеточной петлей (петля 1) CLDN18.2;

(2) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с тем же эпитопом CLDN18.2, что и антитело или конструкция на основе антитела, содержащие домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140;

(3) конструкция на основе антитела по настоящему изобретению конкурирует за связывание с антителом или конструкцией на основе антитела, содержащими домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140;

(4) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 22, и необязательно также связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 24, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 23;

(5) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 14, и/или с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO 15, и необязательно также связывается с одним или несколькими мутантами CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 и 21, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 18;

(6) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению

связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени, где Glu (E) в положении 56 CLDN18.2 человека является необходимым для связывания первого домена, а Ala (A) в положении 42 и/или Asn (N) в положении 45 CLDN18.2 человека не является/являются необходимым(-и) для связывания первого домена; и/или

(7) первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с эпитопом CLDN18.2, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 266, но не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 265, и необязательно также не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 267.

Предпочтительно нацеливание на эпитоп CLDN18.2, который распознается конструкциями на основе антител по настоящему изобретению (см. также пример 2), обеспечивает следующие преимущества:

(1) селективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 по сравнению с CLDN18.1 (см. пример 6) и

(2) неожиданно высокая цитотоксическая активность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 (см. пример 7.4).

Термин "конструкция на основе антитела" относится к молекуле, структура и/или функция которой основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной молекулы иммуноглобулина. Следовательно, конструкция на основе антитела иммуноспецифически связывается со своей мишенью или антигеном, и/или она содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и/или вариабельную область легкой цепи (VL) антитела или содержит домены, полученные из них. Для конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению предусмотрены минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают возможность иммуноспецифического связывание мишени. Данное минимальное требование, например, может определяться присутствием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VH-области), предпочтительно всех шести CDR. Следовательно, конструкция на основе антитела может характеризоваться наличием трех или шести CDR в одном или обоих связывающих доменах, и специалисту в данной области известно, где (в каком порядке) данные CDR расположены в пределах связывающего домена.

Определение "антитела" согласно настоящему изобретению включает полноразмерные антитела, также включая антитела верблюдовых и другие иммуноглобулины, полученные с помощью способов или процессов биотехнологии или белковой инженерии. Данные полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела, а также антитела других биологических видов, например, мыши, хомяка, кролика, крысы, козы или отличных от человека приматов.

"Конструкции на основе антител" по настоящему изобретению могут иметь структуру полноразмерного иммуноглобулина, встречающегося в природе. Например, они могут содержать (по меньшей мере) две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Однако, принимая во внимание то, что конструкции на основе антител согласно настоящему изобретению содержат один домен, связывающийся с CLDN18.2, и другой домен, связывающийся с CD3, они не встречаются в природе, и их функция заметно отличается от встречающихся в природе продуктов. Следовательно, конструкция на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой искусственную "гибридную" молекулу, содержащую по меньшей мере два отдельных связывающих домена с отличающейся специфичностью.

"Конструкции на основе антител" по настоящему изобретению также могут содержать фрагменты полноразмерных антител, такие как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, легкая цепь (VL-CL), Fd (VH-CH1), тяжелая цепь, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или "r IgG" ("полуантитело", состоящее из тяжелой цепи и легкой цепи). Конструкции на основе антител согласно настоящему изобретению также могут содержать модифицированные фрагменты антител, также называемые вариантами антител или производными антител. Примеры включают без ограничения scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-застежку, scFab, Fab_2, Fab_3, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные tri-scFv, "мини-тела", проиллюстрированные структурой, которая является следующей: $(VH\text{-}VL\text{-}CH3)_2$, $(scFv\text{-}CH3)_2$, $((scFv)_2\text{-}CH3+CH3)$, $((scFv)_2\text{-}CH3)$ или $(scFv\text{-}CH3\text{-}scFv)_2$, мультитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним вариабельным доменом, содержащие только одну вариабельную область, которая может быть VHH, VH или VL, которая специфически связывается с антигеном или мишенью независимо от других вариабельных областей или доменов. Дополнительными возможными форматами конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению являются кросс-тела, макси-тела, конструкции с гетеро-Fc, конструкции с моно-Fc и конструкции на основе scFc. Примеры данных форматов будут описаны ниже.

Кроме того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает двухвалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции, а также биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связываются с двумя, тремя или более антигенными структурами благодаря отдельным связывающим доменам. Конструкция на основе антитела может иметь больше валентностей связывания, чем специфичностей, например в случае, когда она имеет два связывающих домена для первой мишени (Cldn18.2) и один связывающий домен для второй мишени (CD3) или наоборот, в этом случае конструкция является трехвалентной и биспецифической. В целом, термин "биспецифический" означает, что конструкция на основе антитела связывается (по меньшей мере) с двумя разными антигенами, такими как Cldn18.2 и CD3.

Более того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы состоящие из двух, трех, четырех или более полипептидных цепей, при этом цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомоолигомеры), либо разными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры вышеуказанных антител и их фрагментов, вариантов, производных и конструкций на основе антител, полученных из них, описаны, среди прочего, в Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual, CSHL Press (1988); Kontermann and Dübel, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010; и Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009.

Применительно к настоящему изобретению термин "связывающий домен" или "домен, который связывается с..." характеризует домен конструкции на основе антитела, который иммуноспецифически связывается с/взаимодействует с/распознает эпитоп на мишени или антигене (в данном документе: CLDN18.2 в случае первого домена и CD3 в случае второго домена). Структура и функция первого домена (связывание с CLDN18.2), и предпочтительно также структура и/или функция второго домена (связывание с CD3) основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной молекулы иммуноглобулина. Следовательно для "связывающего домена" или "домена, который связывается с..." могут предусматриваться минимальные структурные требования антитела, которые обеспечивают возможность иммуноспецифического связывания мишени. Данное минимальное структурное требование для первого домена, например, может определяться присутствием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VL-области) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VH-области), предпочтительно всех шести CDR. Предполагается, что для второго домена также предусмотрено данное минимальное структурное требование для антитела, которое обеспечивает возможность иммуноспецифического связывания мишени. Более предпочтительно второй домен также содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VL-области) и/или три CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 из VH-области). "Домен, который связывается с" (или "связывающий домен"), как правило, может содержать вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH); однако он может и не содержать их обе, но содержать только одну VH или VL. Fd-фрагменты, например, зачастую в некоторой мере сохраняют антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена.

Примеры формата "домена, который связывается с" (или "связывающего домена") включают без ограничения полноразмерные антитела, фрагменты полноразмерных антител (такие как VH, VHH, VL), (s)dAb, Fv, легкая цепь (VL-CL), Fd (VH-CH1), тяжелая цепь, Fab, Fab', $F(ab')_2$ или "r IgG" ("полуантитело")), варианты или производные антител, такие как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-застежка, scFab, Fab_2, Fab_3, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные tri-scFv, "мини-тела" (выбранные из таких форматов, как $(VH\text{-}VL\text{-}CH3)_2$, $(scFv\text{-}CH3)_2$, $((scFv)_2\text{-}CH3+CH3))$, $((scFv)_2\text{-}CH3)$ или $(scFv\text{-}CH3\text{-}scFv)_2$, мультитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним вариабельным доменом, содержащие только одну вариабельную область, которая может быть VHH, VH или VL. Дополнительные примеры формата "домена, который связывается с" (или "связывающего домена") включают: (1) фрагмент или вариант антитела, содержащие VL, VH, CL и CH1 (такой как Fab); (2) фрагмент или вариант антитела, содержащие два связанные Fab-фрагмента (такие как $F(ab')_2$); (3) фрагмент или вариант антитела, содержащие VH и CH_1 (такие как Fd); (4) фрагмент или вариант антитела, содержащие VL и CL (такие как легкая цепь); (5) фрагмент или вариант антитела, содержащие VL и VH (такие как Fv); (5) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который имеет VH-домен; (6) вариант антитела, содержащий по меньшей мере три выделенные CDR тяжелой и/или легкой цепи; и (7) одноцепочечный Fv (scFv). Примеры вариантов осуществления конструкций на основе антител или связывающих доменов согласно настоящему изобретению описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предусмотрено, что:

a) конструкция на основе антитела представляет собой одноцепочечный полипептид или конструкцию на основе одноцепочечного антитела,

b) первый домен находится в формате scFv,

c) второй домен находится в формате scFv,

d) первый и второй домены связаны посредством линкера, предпочтительно пептидного линкера, более предпочтительно глицинового/серинового линкера, и/или

e) конструкция на основе антитела содержит домен, обеспечивающий увеличенный период полужизни в сыворотке крови, например Fc-домен.

Конструкции на основе антител по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой "конструкции на основе антител, полученные in vitro" и/или "конструкции на основе рекомбинантных антител". В контексте настоящего изобретения термин "полученная in vitro" относится к конструкции на основе антитела согласно приведенному выше определению, у которых весь/вся связывающий домен или вариабельная область или их часть (например, по меньшей мере, одна CDR) получены путем отбора в неиммунных клетках, например, с помощью фагового дисплея in vitro, на белковом чипе или с помощью любого другого способа, при котором кандидатные аминокислотные последовательности можно тестировать в отношении их способности связываться с антигеном. Таким образом, данный термин предпочтительно исключает последовательности, полученные исключительно за счет геномной реаранжировки в иммунной клетке животного. Подразумевается, что первый и/или второй домен конструкции на основе антитела производят или получают с помощью фагового дисплея или способов скрининга библиотек, а не путем прививания последовательностей CDR из предсуществующего (моноклонального) антитела на остов. "Конструкция на основе рекомбинантного антитела" представляет собой конструкцию на основе антитела, созданную или полученную с применением (среди прочего) технологии рекомбинантной ДНК или генной инженерии.

Предполагается, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению являются моноклональными. Используемые в данном документе антитела или конструкции на основе антител, которые обозначены как "моноклональные" (mAb), получены из популяции практически однородных антител/конструкций на основе антител, т. е. отдельные антитела/конструкции на основе антител, входящие в состав популяции, являются идентичными (в частности, с точки зрения их аминокислотной последовательности), за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, вариантов изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела/конструкции на основе антител являются высокоспецифичными, будучи направленными против одного эпитопа в пределах антигена, в отличие от препаратов на основе поликлональных антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные против разных детерминант (или эпитопов). Кроме своей специфичности, преимущество моноклональных антител заключается в том, что они синтезируются гибридомной культурой, следовательно, они не загрязнены другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на природу антитела/конструкции на основе антитела как полученного из практически однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела с помощью какого-либо конкретного способа.

Для получения моноклональных антител можно применять любую методику, обеспечивающую получение антител с помощью культур перевиваемых клеточных линий. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению, можно получать с помощью способа гибридомы, впервые описанного в Koehler et al., Nature, 256: 495 (1975), или можно получать с помощью способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных методик получения человеческих моноклональных антител включают методику триомы, методику гибридомы с В-клетками человека (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) и методику EBV-гибридомы (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Затем гибридомы подвергают скринингу с применением стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE™) для идентификации одной или нескольких гибридом, продуцирующих антитело, которое иммуноспецифически связывается с определенным антигеном. В качестве иммуноген можно применять любую форму соответствующего антигена, например, рекомбинантный антиген, существующие в природе формы, любые его варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIAcore™, можно применять для повышения эффективности представленных на фаге антител/конструкций на основе антител, которые связываются с эпитопом антигена-мишени (Schier, Human

Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Другой иллюстративный способ получения конструкций на основе антител или связывающих доменов включает скрининг библиотек белковой экспрессии, например, библиотек фагового дисплея или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

В дополнение к применению дисплейных библиотек соответствующий антиген можно применять для иммунизации отличного от человека животного, например грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте осуществления отличное от человека животное содержит по меньшей мере часть гена иммуноглобулина человека. Например, можно создавать линии мышей с дефицитом продуцирования мышиных антител, имеющих крупные фрагменты локусов генов Ig (иммуноглобулина) человека. С помощью гибридомной технологии можно получать и отбирать антиген-специфические моноклональные антитела, получаемые из генов с требуемой специфичностью. См., например, Xenomouse™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также можно получать из отличного от человека животного, а затем модифицировать, например, гуманизировать, деиммунизировать, получать химерное антитело с применением методик рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники. Примеры конструкций на основе модифицированных антител или связывающих доменов включают гуманизированные варианты не являющихся человеческими антител/конструкций на основе антител, конструкции на основе подвергнутых "созреванию аффинности" антител или связывающих доменов (см., например, Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991)) и варианты и мутантные антитела с измененной эффекторной функцией(-ями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), упомянутый выше , и Little (2009), упомянутый выше).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, за счет которого В-клетки продуцируют антитела с повышенной аффинностью к антигену в ходе иммунного ответа. При повторных воздействиях тем же антигеном хозяин будет продуцировать антитела с постепенно возрастающей аффинностью. Подобно природному аналогу созревание аффинности in vitro основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности in vitro было успешно применено для оптимизации антител, фрагментов антител, вариантов антител, конструкций на основе антител или связывающих доменов. Случайные мутации внутри CDR вводят с применением ионизирующего излучения, химических мутагенов или ПЦР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено за счет шаффлинга цепей. Два или три раунда введения мутаций и селекции с применением таких методик дисплея, как фаговый дисплей, обычно приводят к антителам, фрагментам антител, вариантам антител, конструкциям на основе антител или связывающим доменам с аффинностями в низком наномолярном диапазоне.

Предпочтительный изменчивости за счет введения аминокислотных замен в конструкции на основе антител или связывающие домены по настоящему изобретению включает замену одного или более остатков в пределах гипервариабельного участка структуры исходного антитела (например, структуры гуманизированного или человеческого антитела). Обычно полученные варианты, отобранные для дальнейшей разработки, будут характеризоваться улучшенными биологическими свойствами по сравнению со структурой исходного антитела, из которого они получены. Применимый способ получения таких вариантов с заменами включает созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, несколько участков гипервариабельной области (например, 6-7 участков) подвергают мутациям с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Полученные таким образом варианты представляют в моновалентном виде на частицах нитевидного фага в качестве молекул слияния с продуктом гена III из M13, упакованных в каждой частице. Затем представленные на фаге варианты подвергают скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания), как раскрыто в данном документе. Чтобы идентифицировать кандидатные участки гипервариабельной области, вносящие значительный вклад в связывание антигена (кандидаты для модификации), также можно проводить аланин-сканирующий мутагенез. В качестве альтернативы или дополнения может быть целесообразно провести анализ кристаллической структуры комплекса между антигеном и конструкцией на основе антитела или антигенсвязывающим фрагментом для идентификации точек контакта между связывающим доменом и его специфическим антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены согласно методикам, разработанным в данном документе. После получения таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу, описанному в данном документе, и антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, конструкции на основе антител или связывающие фрагменты с превосходящими свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах можно отбирать для дальнейшей разработки.

Конструкции на основе антител и связывающие домены по настоящему изобретению, в частности, включают "химерные" версии, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного биологического вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого биологического вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам или вариантам таких антител при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Представляющие интерес конструкции на основе химерных антител или связывающие домены в данном документе включают конструкции на основе "приматизированных" антител, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельных доменов, полученные от отличного от человека примата (например, мартышковой обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.), и последовательности константных участков человека. Был описан целый ряд подходов к получению химерных антител или конструкций на основе антител. См. например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. ScL U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

Антитело, конструкция на основе антитела, фрагмент антитела, вариант антитела или связывающий домен также можно модифицировать путем специфической делеции T-клеточных эпитопов человека (способ называется "деиммунизация") с применением способов, раскрытых, например, в WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, вариабельные домены тяжелой и легкой цепи антитела, конструкции на основе антитела или связывающего домена можно проанализировать на наличие пептидов, которые связываются с MHC класса II; данные пептиды представляют собой потенциальные T-клеточные эпитопы (как определено в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных T-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "протягивание пептидов", и, кроме того, в базе данных пептидов, связывающих молекулы MHC класса II человека, можно осуществить поиск мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Данные мотивы связываются с любым из 18 основных DR-аллотипов молекул MHC класса II и, таким образом, входят в состав потенциальных T-клеточных эпитопов. Обнаруженные потенциальные T-клеточные эпитопы можно элиминировать за счет замены небольшого количества аминокислотных остатков в вариабельных доменах или вариабельных областях или предпочтительно за счет одиночных аминокислотных замен. Как правило, выполняют консервативные замены. Зачастую, но не обязательно, можно использовать аминокислоту, обычно встречающуюся в этом положении в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson, et al. (1992) J. MoI. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Каталог V BASE (www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php) представляет исчерпывающий каталог последовательностей вариабельных областей иммуноглобулина человека (составлен Tomlinson, LA. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Кембридж, Великобритания). Данные последовательности можно применять в качестве источника последовательностей человека, например, для каркасных участков и CDR. Также можно применять консенсусные каркасные области человека, например, описанные в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, их варианты или фрагменты, конструкции на основе антител и связывающие домены основаны на иммуноглобулинах с преимущественно последовательностями человека, которые содержат минимальную(-ые) последовательность(-и), полученную из иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека. Большей частью гуманизированные антитела, их варианты и фрагменты, конструкции на основе антитела или связывающие домены основаны на иммуноглобулинами человека (реципиентные антитела), в которых остатки из гипервариабельной области или CDR заменены на остатки из гипервариабельной области или CDR от отличного от человека биологического вида (донорное антитело), такого как грызун (например, мышь, хомяк, крыса или кролик), характеризующиеся требуемой специфичностью, аффинностью, емкостью и/или биологической активностью. В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) Fv в иммуноглобулине человека замещены на соответствующие остатки антитела, не являющегося человеческим. Кроме того, "гуманизированные антитела", их варианты или фрагменты, конструкции на основе антител или связывающие домены, применяемые в данном документе, также могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Данные модификации выполняют для дальнейшего улучшения и оптимизации эксплуатационных характеристик антитела. Гуманизированные антитела, их варианты или фрагменты, конструкции на основе антител и связывающие домены также могут включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (такую как Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные подробности см. в Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела, их варианты или фрагменты, конструкции на основе антитела или связывающие домены можно получать путем замены последовательностей из вариабельного области (Fv), не вовлеченных непосредственно в связывание антигена, эквивалентными последовательностями из вариабельных областей (Fv) человека. Иллюстративные способы получения таких молекул представлены в Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; и в US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205 и US 6407213. Данные способы включают выделение последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все вариабельные области (Fv) иммуноглобулина или их части, из по меньшей мере одной тяжелой или легкой цепи, манипуляции с ними и их экспрессию. Такие нуклеиновые кислоты можно получать из гибридомы, продуцирующей антитело против заранее определенной мишени, как описано выше, а также из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, его вариант или фрагмент, конструкцию на основе антитела или связывающий домен, затем можно клонировать в соответствующий вектор экспрессии.

Гуманизированные антитела, их варианты или фрагменты, конструкции на основе антител и связывающие фрагменты также можно получать с применением трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепей человека, но не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши. Winter описывает иллюстративный способ прививания CDR, который можно применять для получения гуманизированных молекул, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Все CDR конкретной последовательности человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR, не являющейся человеческой, или только некоторые CDR могут быть заменены CDR, не являющимися человеческими. Необходимо заменить только ряд CDR, требуемых для связывания гуманизированной молекулы с заранее определенным антигеном.

Гуманизированное антитело, его вариант или фрагмент, конструкцию на основе антитела или связывающий домен можно оптимизировать путем введения консервативных замен, замен из консенсусных последовательностей, замен на остатки из молекул зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулинов можно получать за счет любой из нескольких методик, известных в данной области техники (например, Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, и EP 239 400).

Ответы в выработкой человеческого антитела к антителам мыши (HAMA) привели данную отрасль к созданию химерных или иным способом гуманизированных антител/конструкций на основе антител. Однако ожидается, что будут наблюдаться ответы с выработкой определенных человеческих антител к химерным антителам (HACA), в частности, в случаях постоянного или многодозового применения антитела или конструкции на основе антитела. Таким образом, было бы желательно обеспечить конструкции на основе антител, содержащие человеческий связывающий домен против CLDN18.2 и/или человеческий связывающий домен против CD3, чтобы снять проблемы и/или эффекты ответа с выработкой HAMA или HACA.

Следовательно, согласно одному варианту осуществления конструкция на основе антитела, первый связывающий домен и/или второй связывающий домен являются "человеческими". Термин "человеческое антитело", "конструкция на основе человеческого антитела" и "человеческий связывающий домен" включает антитела, конструкции на основе антител и связывающие домены соответственно, имеющие полученные из антитела области, такие как вариабельная и константная области или домены, которые в основном соответствуют последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии человека, известных в данной области техники, включая, например, описанные в Kabat et al. (1991) (упомянутый выше). Конструкции на основе человеческих антител или связывающие домены по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, образованные в результате мутаций, вводимых путем случайного или сайт-специфического мутагенеза in vitro или соматических мутаций in vivo), например в CDR, и, в частности, в CDR3. В конструкциях на основе человеческих антител или связывающих домен по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений могут быть замещены аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Определение человеческих антител, конструкций на основе антител и связывающих доменов, используемое в данном документе, также подразумевает полностью человеческие антитела, конструкции на основе антител и связывающие домены, которые включают только неискусственные и/или генетически неизмененные последовательности человеческих антител, которые могут быть получены с применением методик или систем, таких как Xenomouse.

При использовании конструкций на основе антител, содержащих по меньшей мере один человеческий связывающий домен, избегают некоторых проблем, ассоциированных с антителами или конструкциями на основе антител, которые имеют вариабельные и/или константные области, не относящиеся к человеческим, такие как области от грызунов (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Присутствие таких полученных от грызунов белков может приводить к быстрому выведению антител или конструкций на основе антител или может приводить к выработке иммунного ответа на антитело или конструкцию на основе антитела у пациента. Чтобы избежать применения конструкций на основе полученных от грызунов антител, можно создавать конструкции на основе гуманизированных или полностью человеческих антител путем введения в организм грызуна функциональных участков человеческого антитела таким образом, чтобы в организме грызуна вырабатывались полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и воссоздавать человеческие локусы размером порядка миллиона пар оснований в YAC и вводить их в зародышевую линию мыши обеспечивает эффективный подход для изучения функциональных компонентов очень крупных или грубо картированных локусов, а также для создания полезных моделей заболевания человека. Кроме того, применение такой технологии для замены мышиных локусов их человеческими эквивалентами могло бы обеспечить уникальную информацию об экспрессии и регуляции продуктов генов человека во время развития, их взаимодействии с другими системами и их вовлечения в индуцирование и прогрессирование заболеваний.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов иммуноглобулина (Ig) человека в мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, предоставляет возможность изучения механизмов, лежащих в основе программируемой экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии B-клеток. Кроме того, такая стратегия могла бы обеспечить идеальный источник для продуцирования полностью человеческих моноклональных антител (mAb) – важной вехи на пути к воплощению терапии антителами при заболеваниях человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции на основе антител, полученные из них, сведут к минимуму иммуногенные и аллергические ответы, присущие мышиным или дериватизрованым мышиным mAb, и, таким образом, повысят эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций на основе антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкций на основе антител обеспечит существенное преимущество при лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаление, аутоиммунные реакции и рак, при которых требуется повторное введение соединений.

Один подход в направлении этой цели заключался в конструировании линий мышей с дефицитом продуцирования мышиных антител, имеющих крупные фрагменты локусов Ig человека в предвкушении, что такие мыши будут вырабатывать большой репертуар человеческих антител в отсутствие мышиных антител. Крупные фрагменты Ig человека будут сохранять большое разнообразие генов вариабельных областей, а также надлежащее регулирование выработки и экспрессии антитела. При использовании мышиного аппарата для расширения разнообразия и отбора антител и отсутствии иммунологической толерантности к человеческим белкам воспроизводимый репертуар человеческих антител в этих линиях мышей должен приводить к получению высокоаффинных антител против любого представляющего интерес антигена, включая антигены человека. Используя технологию гибридомы, можно было бы легко получать и проводить отбор антиген-специфических человеческих mAb с требуемой специфичностью. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с созданием первых линий мышей XenoMouse (см. Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)). Линии XenoMouse были сконструированы с помощью дрожжевых искусственных хромосом (YAC), содержащих фрагменты размером 245 т. п. и 190 т. п. в конфигурации зародышевой линии из локуса тяжелой цепи и локуса каппа легкой цепи человека соответственно, которые содержали коровые последовательности вариабельной и константной области. YAC, содержащие человеческий Ig, оказались совместимыми с мышиной системой в отношении как реаранжировки, так и экспрессии антител, и были способны заменить инактивированные гены Ig мыши. Это было продемонстрировано за счет их способности индуцировать развитие B-клеток, продуцировать человеческий репертуар взрослого типа, состоящий из полностью человеческих антител, и получать антиген-специфические человеческие mAb. Данные результаты также позволяют предположить, что введение более крупных частей локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных областей Ig человека, могло бы практически полностью повторять полный репертуар, который характерен для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. была расширена введением больше, чем приблизительно 80% репертуара человеческих антител посредством введения в составе YAC фрагментов размером порядка миллиона пар оснований локуса тяжелой цепи и локуса каппа легкой цепи человека соответственно в конфигурации зародышевой линии. См. Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) и заявку на патент США с порядковым № 08/759620.

Получение модели XenoMouse дополнительно обсуждается и описано в заявках на патент США, порядковый № 07/466008, порядковый № 07/610515, порядковый № 07/919297, порядковый № 07/922649, порядковый № 08/031801, порядковый № 08/112848, порядковый № 08/234145, порядковый № 08/376279, порядковый № 08/430938, порядковый № 08/464584, порядковый № 08/464582, порядковый № 08/463191, порядковый № 08/462837, порядковый № 08/486853, порядковый № 08/486857, порядковый № 08/486859, порядковый № 08/462513, порядковый № 08/724752 и порядковый № 08/759620; а также в патентах США №№ 6162963; 6150584; 6114598; 6075181 и 5939598, и патентах Японии №№ 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие исследователи, включая GenPharm International, Inc., использовали подход "минилокус". В подходе минилокуса локус экзогенного Ig имитируют путем включения частей (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или несколько генов VH, один или несколько генов DH, один или несколько генов JH, константную область мю-цепи и вторую константную область (предпочтительно константную область гамма-цепи) составляют в конструкцию для вставки в организм животного. Этот подход описан в патенте США № 5545807 под авторством Surani et al. и патентах США №№ 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299 и 6255458, каждый под авторством Lonberg и Kay, патентах США № 5591669 и 6023010 под авторством Krimpenfort и Berns, патентах США №№ 5612205; 5721367 и 5789215 под авторством Berns et al. и патенте США № 5643763 под авторством Choi и Dunn, и заявке на патент США от GenPharm International с порядковым № 07/574748, порядковым № 07/575962, порядковым № 07/810279, порядковым № 07/853408, порядковым № 07/904068, порядковым № 07/990860, порядковым № 08/053131, порядковым № 08/096762, порядковым № 08/155301, порядковым № 08/161739, порядковым № 08/165699, порядковым № 08/209741. См. также EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. См. дополнительно Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuaillon et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuaillon et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kirin также продемонстрировал создание человеческих антител с использованием мышей, которым были введены крупные участки хромосом или целые хромосомы посредством опосредованного микроклетками слияния. См. заявки на европейский патент №№ 773288 и 843961. Xenerex Biosciences разрабатывают технологию для потенциального создания человеческих антител. В данной технологии мышей SCID восстанавливают с помощью лимфатических клеток человека, например, B- и/или T-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном, и у них может индуцироваться иммунный ответ против этого антигена. См. патенты США №№ 5476996; 5698767 и 5958765.

В некоторых вариантах осуществления конструкции на основе антител по настоящему изобретению являются "выделенными" или "практически полностью чистыми" конструкциями на основе антител. "Выделенные" или "практически полностью чистые" при применении для описания конструкций на основе антител, раскрытых в данном документе, означает конструкцию на основе антитела, которая была идентифицирована, отделена и/или извлечена из компонента среды ее продуцирования. Предпочтительно конструкция на основе антитела не связана или практически полностью не связана со всеми остальными компонентами среды ее продуцирования. Загрязняющие компоненты среды ее продуцирования, такие как происходящие из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые могли бы мешать путям диагностического или терапевтического применения конструкции на основе антитела, и они могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые соединения. Понятно, что в зависимости от обстоятельств выделенная или практически полностью чистая конструкция на основе антитела может составлять от 5% до 99,9% по весу от общего содержания белка/полипептида в данном образце. Требуемую конструкцию на основе антитела можно получить в значительно более высокой концентрации благодаря применению индуцируемого промотора или промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии. Определение включает продуцирование конструкции на основе антитела в самых разнообразных организмах и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления конструкцию на основе антитела будут очищать (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности, определяемой с помощью SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окрашивания кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Однако обычно конструкцию на основе антитела будут получать с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Согласно одному варианту осуществления вся конструкция антитела и/или связывающие домены находятся в форме одного или нескольких полипептидов или в форме белков. Помимо белковых частей, такие полипептиды или белки могут включать небелковые части (например, химические линкеры или химические сшивающие средства, такие как глутаральдегид).

Пептиды представляют собой короткие цепи аминокислотных мономеров, связанных ковалентными пептидными (амидными) связями. Следовательно, пептиды относятся к широким химическим классам биологических олигомеров и полимеров. Аминокислоты, которые являются частью пептидной или полипептидной цепи, называются "остатками" и могут иметь последовательную нумерацию. Все пептиды, за исключением циклических пептидов, имеют N-концевой остаток на одном конце и C-концевой остаток на другом конце пептида. Олигопептид состоит всего из нескольких аминокислот (обычно от двух до двадцати). Полипептидом является более длинная, непрерывная и неразветвленная пептидная цепь. Пептиды отличаются от белков по размеру, и в качестве произвольного ориентира может подразумеваться, что они содержат примерно 50 или меньше аминокислот. Белки состоят из одного или нескольких полипептидов, обычно расположенных таким образом, чтобы обеспечивать биологическую функцию. Хотя аспекты лабораторных методик, применяемых к пептидам по сравнению с полипептидами и белками, отличаются (например, особенности электрофореза, хроматографии и т. д.), границы размеров, которые отличают пептиды от полипептидов и белков, не являются абсолютными. Следовательно, в контексте настоящего изобретения термины "пептид", "полипептид" и "белок" могут использоваться взаимозаменяемо, и зачастую предпочтительным является термин "полипептид".

Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, которые состоят из более одной полипептидной молекулы. Полипептидные молекулы, образующие такие димеры, тримеры и т. п., могут быть идентичными или неидентичными. Следовательно соответствующие структуры таких мультимеров более высокого порядка называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т. п. Примером гетеромультимера является молекула антитела или иммуноглобулина, которая в своей встречающейся в природе форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к модифицированным естественным образом пептидам/полипептидам/белкам, например, где модификация осуществляется за счет посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т. п. При упоминании в данном документе "пептид", "полипептид" или "белок" также могут быть химически модифицированными, как, например, пегилированными. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе ниже.

В соответствии с данным изобретением термины "(специфически или иммуноспецифически) связывается с", "(специфически или иммуноспецифически) распознает" или "(специфически или иммуноспецифически) реагирует с" означают, что конструкция на основе антитела или связывающий домен взаимодействуют или (иммуно-)специфически взаимодействуют с данным эпитопом на молекуле-мишени (антигене), в данном случае: CLDN18.2 и CD3 соответственно. С эпитопом на специфической мишени данное взаимодействие или ассоциация происходят более часто, более быстро, с большей продолжительностью, с большей аффинностью или как некоторая комбинация вышеупомянутого, чем с альтернативными веществами (молекулами, не являющимися мишенями). Однако вследствие сходства последовательностей между гомологичными белками у разных биологических видов конструкция на основе антитела или связывающий домен, которые иммуноспецифически связываются со своей мишенью (такой как молекула-мишень человека), могут перекрестно реагировать с гомологичными молекулами-мишенями от отличных биологических видов (например, отличных от человека приматов). Следовательно термин "специфическое/иммуноспецифическое связывание" может включать связывание конструкции на основе антитела или связывающего домена с эпитопами или структурно родственными эпитопами у более чем одного биологического вида.

В контексте настоящего изобретения термин "эпитоп" относится к части или области антигена, которые распознаются/иммуноспецифически распознаются связывающим доменом. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин "эпитоп" иногда также упоминается как "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Часть связывающего домена, которая связывается с эпитопом, называется паратопом. Полагают, что специфическое связывание осуществляется за счет специфических мотивов в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание обеспечивается за счет их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также за счет потенциальных вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие паратопа с его антигенной детерминантой может приводить к простому связыванию указанного участка с антигеном. В некоторых случаях специфическое взаимодействие в качестве альтернативы или дополнения может приводить к запуска сигнала, например вследствие индуцирования изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т. д.

Эпитопы белковых антигенов делятся на две категории, конформационные эпитопы и линейные эпитопы, в зависимости от их структуры и взаимодействия с паратопом. Конформационный эпитоп состоит из прерывистых участков аминокислотной последовательности антигена. Данные эпитопы взаимодействуют с паратопом с учетом трехмерных характеристик поверхности и формы или третичной структуры (фолдинга) антигена. Способы определения конформации эпитопов включают без ограничения рентгеновскую кристаллографию, двумерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (2D-NMR) и спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (EPR) с сайт-направленным спин-мечением. Напротив, линейные эпитопы взаимодействуют с паратопом ус учетом их первичной структуры. Линейный эпитоп образует непрерывная последовательность аминокислот антигена, и, как правило, он содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и, более часто, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот в виде уникальной последовательности.

Далее описан способ картирования эпитопов CLDN18.2. Заранее определенную область (непрерывный участок из аминокислот) в пределах внеклеточных петель белка CLDN18.2 человека заменяют/замещают соответствующей областью паралога CLDN18.2 (такого как CLDN6 человека или CLDN9 человека, но также допустимы и другие паралоги при условии, что связывающий домен не реагирует перекрестно с используемым паралогом). Данные химеры CLDN18.2 человека/паралог экспрессируют на поверхности клеток-хозяев (таких как клетки CHO). Связывание антитела или конструкции на основе антитела можно тестировать с помощью анализа FACS. Когда связывание антитела или конструкции на основе антитела с химерной молекулой полностью исчезает или когда наблюдается значительное снижение связывания, можно сделать вывод, что область CLDN18.2 человека, которая была удалена из данной химерной молекулы, важна для иммуноспецифического распознавания эпитоп-паратоп. Указанное снижение связывания предпочтительно составляет по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40% или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60%, 70% или 80% и наиболее предпочтительно 90%, 95% или даже 100% по сравнению со связыванием с CLDN18.2 человека (дикий тип), при этом связывание с CLDN18.2 человека принимается за 100%. В качестве альтернативы описанный выше анализ картирования эпитопа можно модифицировать путем введения одной или нескольких точковых мутаций в последовательность CLDN18.2, в частности, в последовательность внеклеточной петли 1 или петли 2. Данные точковые мутации, например, могут отражать отличия между CLDN18.2 и его близкородственным паралогом CLDN18.1. Например, мутации можно выбрать из группы, состоящей из: Q29M, N37D, A42S, N45Q, Q47E, E56Q, G65P и L69I. См. примеры 1 и 2.

Дополнительный способ определения вклада специфического остатка антигена-мишени в распознавание конструкцией на основе антитела или связывающим доменом представляет собой аланиновое сканирование (см., например, Morrison KL & Weiss GA. Cur Opin Chem Biol. 2001 Jun;5(3):302-7), где каждый подлежащий анализу остаток заменяют аланином, например, посредством сайт-направленного мутагенеза. Применение аланина обусловлено наличием в нем небольшой, химически инертной метильной функциональной группы, которая, тем не менее, имитирует предпочтения к вторичной структуре, которыми обладают многие другие аминокислоты. В тех случаях, когда требуется сохранить размер подвергнутых мутации остатков, иногда можно использовать крупные аминокислоты, такие как валин или лейцин.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом антигена-мишени подразумевает, что связывающий домен проявляет заметную или значительную аффинность к эпитопу/антигену-мишени (в данном случае: CLDN18.2 и CD3 соответственно) и, как правило, не проявляет значительной аффинности к белкам или антигенам, отличным от антигена-мишени (в данном случае: CLDN18.2/CD3) - несмотря на обсуждаемую выше перекрестную реактивность с гомологичными мишенями, например от других биологических видов. "Значительная аффинность" включает связывание с аффинностью (константа диссоциации, KD), составляющей $\leq 10^{-6}$ M. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M, или даже $\leq 10^{-11}$ M или $\leq 10^{-12}$ M. Можно легко проверить способен ли связывающий домен (иммуно-)специфически реагировать или связываться с мишенью, например, путем сравнения аффинности указанного связывающего домен к его требуемому белку- или антигену-мишени с аффинностью указанного связывающего домена к белкам или антигенам, не являющимся мишенью (в данном случае: белкам, отличным от CLDN18.2 или CD3 соответственно). Предпочтительно конструкция на основе антитела по настоящему изобретению не связывается в значительной степени с белками или антигенами, отличными от CLDN18.2 или CD3 соответственно (т. е. первый домен не связывается с белками, отличными от CLDN18.2, а второй домен не связывается с белками, отличными от CD3), за исключением тех случаев, когда какой-либо(какие-либо) дополнительный(-е) связывающий(-е) домен(-ы), направленный(-е) против другой мишени, намеренно не введен/введены в конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, и в этом случае связывание этого связывающего домена с его специфической мишенью также предусмотрено в настоящем изобретении.

Предусматривается, что аффинность первого домена к CLDN18.2 (например, CLDN18.2 человека) составляет ≤100 нМ, ≤90 нМ, ≤80 нМ, ≤70 нМ, ≤60 нМ, ≤50 нМ, ≤40 нМ, ≤30 нМ или ≤20 нМ. Данные значения предпочтительно измеряют с помощью анализа на основе клеток, такого как анализ Скэтчарда. См. пример 4. Другие способы определения аффинности также хорошо известны в данной области техники. Дополнительно предусматривается, что аффинность второго домена к CD3 (например, CD3 человека) составляет ≤100 нМ, ≤90 нМ, ≤80 нМ, ≤70 нМ, ≤60 нМ, ≤50 нМ, ≤40 нМ, ≤30 нМ, ≤20 нМ или ≤10 нМ. Данные значения предпочтительно измеряют в анализе поверхностного плазмонного резонанса, таком как анализ Biacore. См. пример 3.

Термин "не связывается в значительной степени" означает, что конструкция на основе антитела или связывающий домен по настоящему изобретению не связываются с белком или антигеном, отличным от CLDN18.2 или CD3, когда указанный белок или антиген экспрессируются на поверхности клетки. Следовательно, конструкция на основе антитела демонстрирует реактивность, составляющую ≤30%, предпочтительно ≤20%, более предпочтительно ≤10%, особенно предпочтительно ≤9%, ≤8%, ≤7%, ≤6%, ≤5%, ≤4%, ≤3%, ≤2% или ≤1% в отношении белков или антигенов, отличных от CLDN18.2 или CD3 (когда указанные белки или антигены экспрессируются на поверхности клетки), при этом связывание с CLDN18.2 или CD3 соответственно принимается за 100%. Например, "реактивность" может выражаться как значение аффинности (см. выше).

Предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению (и, более конкретно, ее первый домен) не связывается или не связывается в значительной степени с паралогами CLDN18.2, более конкретно с паралогами CLDN18.2 человека и/или с паралогами CLDN18.2 макака/макака-крабоеда. Также предполагается, что конструкция на основе антитела не связывается или не связывается в значительной степени с паралогами CLDN18.2 (человека или макака/макака-крабоеда) на поверхности клетки-мишени. Паралоги CLDN18.2 включают без ограничения CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9. Согласно одному варианту осуществления паралоги CLDN18.2 человека имеют последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 2-10. См. пример 6 и фигуру 6. Следовательно, предполагается, что первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению не связывается или не связывается в значительной степени с CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и/или CLDN9 (на поверхности клетки-мишени).

Первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени. "Клетка-мишень" может быть представлять собой любую прокариотическую или эукариотическую клетку, экспрессирующую CLDN18.2 на своей поверхности; предпочтительно клетка-мишень представляет собой клетку, которая является частью организма человека или животного, такую как специфическая раковая или опухолевая клетка, экспрессирующая CLDN18.2, или клетка из CLDN18.2-положительного новообразования. Понятно, что в контексте настоящего изобретения термин "на поверхности" означает, что первый домен конструкции на основе антитела специфически связывается с эпитопом, содержащимся в пределах первой внеклеточной петли CLDN18.2 (ECL1 CLDN18.2), в пределах второй внеклеточной петли CLDN18.2 (ECL2 CLDN18.2) или содержится в пределах комбинации обеих петель. Следовательно, предполагается, что первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с внеклеточной петлей CLDN18.2, предпочтительно CLDN18.2 человека. Внеклеточная петля может представлять собой первую петлю или вторую петлю. Также предполагается, что обе петли вносят вклад в связывание. В данном случае возможно, что одна петля (такая как первая петля) представляет главного партнера по связыванию для конструкции на основе антитела, а другая петля (такая как вторая петля) вносит вклад в связывание, например, в качестве стабилизирующего партнера, но не является абсолютно необходимой для связывания. Следовательно, первый домен по настоящему изобретению может связываться с CLDN18.2, когда он экспрессируется в клетках или клеточных линиях с его естественной экспрессией (например, линиях рака желудка человека SNU-601, SNU-620 или также SNU-16, NUGC, NUG- C4, GSU или IM95) и/или клетках или клеточных линиях, трансформированных или (стабильно/временно) трансфицированных CLDN18.2. В одном варианте осуществления первый домен связывается с CLDN18.2, когда CLDN18.2 используется в качестве молекулы-мишени в анализе связывания на основе клеток, например анализе по Скэтчарду (см., например, пример 4). Кроме того, предполагается, что конструкция на основе антитела/ее первый домен связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени. Предпочтительная аминокислотная последовательность CLDN18.2 человека приведена под SEQ ID NO: 1.

Предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению (и, более конкретно, первый домен указанной конструкции на основе антитела) связывается с первой внеклеточной петлей (ECL1, петля 1) CLDN18.2. Это не обязательно исключает, что вторая внеклеточная петля также вносит вклад, хотя и в меньшей степени, в участок взаимодействия паратоп-эпитоп. Термин "CLDN18.2 ECL" (ECL=внеклеточная петля) относится к тем частям CLDN18.2, которые практически не содержат трансмембранный и цитоплазматический домены CLDN18.2. Понятно, что трансмембранные домены, идентифицированные для полипептида CLDN18.2 по настоящему изобретению, идентифицируют в соответствии с критериями, традиционно используемыми в данной области техники для идентификации данного типа гидрофобного домена. Точные границы трансмембранного домена могут варьироваться, но, весьма вероятно, на не более чем приблизительно 5 аминокислот на каждом конце домена, конкретно упоминаемого в данном документе. Предпочтительная ECL1 CLDN18.2 человека показана под SEQ ID NO: 2, а предпочтительная ECL2 CLDN18.2 человека показана под SEQ ID NO: 3.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено, что:

• первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с тем же эпитопом CLDN18.2, что и антитело или конструкция на основе антитела, содержащие домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140;

• конструкция на основе антитела по настоящему изобретению конкурирует за связывание с антителом или конструкцией на основе антитела, содержащими домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140;

• первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 22, и необязательно также связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 24, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 23;

• первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 14, и/или с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO 15, и необязательно также связывается с одним или несколькими мутантами CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 и 21, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 18;

- первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени, где Glu (E) в положении 56 CLDN18.2 человека является необходимым, а Ala (A) в положении 42 и/или Asn (N) в положении 45 CLDN18.2 человека не является/являются необходимым(-и) для связывания первого домена; и/или
- первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с эпитопом CLDN18.2, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 266, но не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 265, и необязательно также не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 267.

Другие вещества, связывающие CLDN18.2 (CL-3, CL-4), также анализировали в отношении их специфичности связывания с CLDN18.2 во время картирования эпитопа (см. пример 2). Было обнаружено, что данные конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 обладают отличающейся эпитопной специфичностью, и в то же время было показано, что они характеризуются значительно более низким цитотоксическим потенциалом по сравнению с конструкциями на основе антител по настоящему изобретению. В примере 7.4 было продемонстрировано, что для конструкций на основе антител по настоящему изобретению продемонстрированы значения EC_{50} в двузначном пикомолярном диапазоне, в то время как для сравнительных конструкций продемонстрированы значения EC_{50} в трехзначном - пятизначном пикомолярном диапазоне, несмотря на наличие аналогичной аффинности к CLDN18.2. Конструкции на основе антител, демонстрирующие цитотоксическую активность во втором диапазоне, могут быть недостаточно эффективными для терапевтического применения в управлении иммунной системой пациента, более конкретно цитотоксической активностью T-клеток против раковых клеток. С другой стороны, для конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению характерна очень благоприятная взаимосвязь между эпитопом и активностью, следовательно поддерживается сильная цитотоксическая активность, опосредованная конструкцией на основе антитела.

Связывается ли антитело, конструкция на основе антитела или связывающий домен с тем же эпитопом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, что и другое данное антитело, конструкция на основе антитела или связывающий домен, можно измерить с помощью различных анализов, описанных в данном документе, например с помощью картирования эпитопа с химерными или подвергнутыми мутации молекулами CLDN18.2, как описано в данном документе выше или в примерах 1 и 2. В данном документе описаны другие способы определения эпитопов, такие как аланиновое сканирование.

Конкурирует ли антитело или конструкция на основе антитела за связывание с антигеном (таким как CLDN18.2) на поверхности клетки-мишени с другим данным антителом или конструкцией на основе антитела, можно измерить с помощью конкурентного анализа, такого как конкурентный анализ ELISA. Также можно использовать микрочастицы (гранулы) со связанным авидином. Аналогично покрытому авидином планшету для ELISA при проведении реакции с биотинилированным белком каждая из этих гранул может использоваться в качестве субстрата, на котором может проводиться анализ. Гранулу покрывают антигеном, а затем ее предварительно покрывают первым антителом. Добавляют второе антитело и определяют присутствие какого-либо дополнительного связывания. Считывание проводят с помощью проточной цитометрии. Предпочтительно используют конкурентный анализ на основе клеток с применением либо клеток, которые в экспрессируют CLDN18.2 естественным образом, либо клеток, которые были стабильно или временно трансформированы CLDN18.2. В данном контексте термин "конкурирует за связывание" означает, что между двумя тестируемыми антителами происходит конкуренция на уровне, составляющем по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%, как определено с помощью любого из анализов, раскрытых выше, предпочтительно анализа на основе клеток. Конечно, такой же анализ можно применить и к другим мишеням, таким как CD3.

Анализы конкурентного связывания антител включают анализы, определяющие конкурентное связывание двух антител/конструкций на основе антител с антигеном, связанным с поверхностью клеток. Традиционные способы, направленные на обнаружение связывания двух антител/конструкций на основе антител, A и B, с одним и тем же антигеном на поверхности клетки, могут включать следующие стадии:

a) блокирование антигена на поверхности клетки путем предварительной инкубации клеток с антителом/конструкцией на основе антитела A, а затем добавление субмаксимального количества меченого антитела/конструкции на основе антитела B и обнаружение связывания B по сравнению со связыванием в отсутствие A;

b) титрование (т. е. добавление различных количеств) антитела/конструкции на основе антитела A в присутствии субмаксимальных количеств меченого антитела/конструкции на основе антитела B и обнаружение влияния на связывание B; или

c) совместное титрование A и B, при котором оба антитела/обе конструкции на основе антитела инкубируют вместе при максимальной концентрации, и обнаружение того, равно ли общее связывание или превышает ли оно связывание A или B отдельно, т. е. способ, на который не может повлиять порядок добавления или относительные количества антител/конструкций на основе антител.

Когда два антитела/две конструкции на основе антитела A и B конкурируют за антиген, связанный с поверхностью клетки, антитела очень часто будут конкурировать друг с другом в анализах блокирования независимо от порядка добавления антител. Другими словами, конкуренция обнаруживается, если анализ проводится в любом направлении. Однако это не всегда так, и при определенных обстоятельствах порядок добавления антител или направление анализа могут оказывать влияние на генерируемый сигнал. Это может быть обусловлено отличиями в аффинности или авидности потенциально конкурирующих антител/конструкций на основе антител. Если порядок добавления оказывает значительное влияние на генерируемый сигнал, делают заключение, что два антитела/две конструкции на основе антитела действительно конкурируют, если конкуренция обнаруживается по меньшей мере при одном порядке.

Согласно одному варианту осуществления первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени, где Glu (E) в положении 56 CLDN18.2 человека является необходимым для связывания первого домена, а Ala (A) в положении 42 и/или Asn (N) в положении 45 CLDN18.2 человека не является/являются необходимым(-и) для связывания первого домена. В этом контексте термин "является необходимым для связывания" означает, что указанная аминокислота (Glu в положении 56) является необходимой для того, чтобы произошло связывание конструкции на основе антитела с CLDN18.2. Если заменить аминокислоту Glu в положении 56, например, на Gln (□ E56Q), связывание конструкции на основе антитела исчезает или значительно снижается (см. фигуру 4, столбец, обозначенный "P6"). Термин "не является необходимым для связывания" означает, что указанная аминокислота (Ala в положении 42 и/или Asn в положении 45) не является необходимой для того, чтобы произошло связывание конструкции на основе антитела с CLDN18.2. Если заменить аминокислоту Ala в положении 42 и/или Asn в положении 45, например, на Ser в положении 42 (□ A42S) и/или Gln в положении 45 (□ N45Q), связывание конструкции на основе антитела не снижается или незначительно снижается (см. фигуру 4, столбцы, обозначенные "P3" и "P4").

Согласно одному варианту осуществления первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

a) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 123, CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 126; и

b) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 135, и CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенной под SEQ

ID NO: 138.

В контексте настоящего изобретения термин "вариабельный" относится к тем частям доменов антител или иммуноглобулинов, которые проявляют вариабельность своей последовательности и которые также вовлечены в определение специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т. е. к "вариабельной(-ым) области(-ям)"). Обычно при спаривании вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) вместе образуется один антигенсвязывающий участок.

Вариабельность неравномерно распределена по всему протяжению вариабельных областей антител; она сконцентрирована в субдоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Данные субдомены называются "гипервариабельными областями" или "областями, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (т. е. не являющиеся гипервариабельными) части вариабельных областей называются "каркасными" (FR) областями, и они обеспечивают остов для шести CDR в трехмерном пространстве для образования антигенсвязывающей поверхности. Каждая из вариабельных областей тяжелых и легких цепей встречающихся в природе антител содержит четыре области FR (FR1, FR2, FR3 и FR4), которые главным образом принимают конфигурацию β-складчатого слоя. Вместе с CDR они образуют следующую последовательность в пределах вариабельной области тяжелой или легкой цепи: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью каркасных областей и обычно вместе с гипервариабельными областями другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего участка (см. Kabat et al., упомянутый выше).

Термин "CDR" и его множественное число относятся к области, определяющей комплементарность, при этом три области придают связывающий характер вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а три области придают связывающий характер вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфические взаимодействия антитела (или конструкции на основе антитела или связывающего домена) с антигеном и, следовательно, вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела: они являются главными детерминантами специфичности к антигену.

Точное определение границ и длины CDR является предметом разных классификаций и систем нумерации. Следовательно CDR могут указываться согласно Kabat, Chothia, контактной или любой другой системе определения границ, включая систему нумерации, описанную в данном документе. Несмотря на отличающиеся границы, каждая из данных систем имеет некоторую степень перекрывания того, что составляет так называемые "гипервариабельные области" в пределах вариабельных последовательностей. Следовательно, определения CDR согласно данным систем могут отличаться длиной и граничными участками с учетом прилегающей каркасной области. См. например Kabat (подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., упомянутый выше; Chothia et al., J. MoI. Biol, 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al., J. MoI. Biol, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для определения характеристик антигенсвязывающего участка является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В случае, если две методики идентификации остатков определяют области перекрывания, но не идентичные области, их можно комбинировать для определения гибридной CDR. Однако нумерация согласно так называемой системе Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которую принимают антигенсвязывающие (CDR) петли. По результатам сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться углами вращения полипептидного скелета. Следовательно, соответствующие петли у разных антител могут характеризоваться очень подобной трехмерной структурой, несмотря на высокую аминокислотную вариабельность в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. MoI. Biol., 1987, 196: 901; Chothia et al., Nature, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, J. MoI. Biol, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между структурой, принимаемой петлей, и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в пределах петли, а также в пределах консервативной каркасной области (т. е. за пределами петли). Следовательно, отнесение к конкретному каноническому классу можно проводить на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать особенности линейной последовательности антитела, например, перечисленные в Kabat (Kabat et al., упомянутый выше). Схема (система) нумерации по Kabat является широко применяемым стандартом для нумерации аминокислотных остатков вариабельной области антитела последовательным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, что также упоминается в другом месте данного документа. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные структурные особенности. Например, отличия, которые не в полной мере отображает система нумерации по Kabat, можно описать с помощью системы нумерации по Chothia et al. и/или выявить с помощью других методик, например, кристаллографии или двух- или трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно, данную последовательность антитела можно поместить в канонический класс, что позволяет, среди прочего, идентифицировать соответствующие последовательности класса (например, исходя из необходимости включения разнообразных канонических структур в библиотеку). Система нумерации аминокислотных последовательностей антител по Kabat и структурные особенности, описанные Chothia et al., упомянутый выше, а также их применение для интерпретации канонических аспектов структуры антитела, описаны в литературе. Структура субъединиц и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов различных классов хорошо известны из уровня техники. Обзора структуры антитела см. в Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и особенно CDR3 тяжелой цепи могут образовывать наиболее важные детерминанты при связывании антигена в пределах вариабельных областей легкой и тяжелой цепей. В некоторых антителах или конструкциях на основе антител/связывающих доменах CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, образует основную площадь контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора in vitro, в которых варьируется только CDR3, можно использовать для изменения связывающих свойств антитела или конструкции на основе антитела/связывающего домена или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является самым большим источником молекулярного разнообразия в пределах связывающего участка антитела. Например, длина CDR-H3 может составлять всего два аминокислотных остатка или больше 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Константный домен тяжелой цепи (CH), расположенный наиболее близко к VH, обычно обозначается как CH1. Константные ("C") домены не принимают непосредственного участия в связывании антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC) и активация системы комплемента (комплемент-зависимая цитотоксичность, CDC). Fc-область антитела является "хвостовой" областью классического антитела, которая взаимодействует с рецепторами на поверхности клетки, называемыми Fc-рецепторами, и некоторыми белками системы комплемента. В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-область состоит из двух идентичных белковых фрагментов, полученных из второго и третьего константных доменов (CH2 и CH3) двух тяжелых цепей антитела. Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (CH2, CH3 и CH4) в каждой полипептидной цепи. Fc-области также содержат часть так называемой "шарнирной" области, удерживаемой вместе одним или несколькими дисульфидами и нековалентными взаимодействиями. Fc-область встречающегося в природе IgG несет высококонсервативный участок N-гликозилирования. Гликозилирование Fc-фрагмента является необходимым для активности, опосредованной Fc-рецептором.

ADCC представляет собой механизм клеточно-опосредованной иммунной защиты, при этом эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует клетку-мишень, мембранные поверхностные антигены который были связаны специфическими антителами. Для ADCC требуется наличие иммунной эффекторной клетки, которая, как известно, классически представляет собой клетку-натурального киллера (NK), которая, как правило, взаимодействует с антителами IgG. Однако ADCC также могут опосредовать макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы. ADCC включает активацию эффекторных клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы, за счет антител, экспрессирующих Fc-часть. Например, наиболее распространенный Fc-рецептор на поверхности NK-клетки называется CD16 или FcγRIII. Как только Fc-рецептор связывается с Fc-областью IgG, NK-клетка высвобождает цитотоксические факторы, вызывающие гибель клетки-мишени. Аналогично Fc-рецептор (FceRI) эозинофила будет распознавать IgE. Наоборот, при CDC молекула "C1q" системы комплемента связывается с Fc-областью антитела, и данное связывание запускает каскад системы комплемента, который приводит к образованию мембраноатакующего комплекса (MAC) на поверхности клетки-мишени, в результате классического пути активации системы комплемента. В случае терапевтических антител или конструкциях на основе антител как ADCC, так и CDC можно модулировать с помощью конструирования изотипа Fc, генетических мутаций в Fc или модификаций профиля гликозилирования Fc.

Последовательность генов антител после сборки и соматической мутации очень сильно меняется, по оценкам эти измененные гены кодируют 10^{10} различных молекул антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, в иммунной системе обеспечивается репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится к по меньшей мере одной нуклеотидной последовательности, полностью или частично полученной из по меньшей мере одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(-и) можно получить путем in vivo реаранжировки V-, D- и J-сегментов генов тяжелых цепей и V- и J-сегментов генов легких цепей. В качестве альтернативы последовательность(-и) можно получать из клетки, например, при стимуляции in vitro, в ответ на которую происходит реаранжировка. В качестве альтернативы часть или всю(все) последовательность(-и) можно получать посредством сплайсинга ДНК, нуклеотидного синтеза, мутагенеза и других способов, см., например, патент США 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать совокупность последовательностей, включая последовательности из генетически разнородной коллекции.

Предполагается, что конструкция на основе антитела имеет цистеиновый зажим в пределах первого домена. Данный цистеиновый зажим может быть введен для улучшения стабильности конструкции. См., например, US 2016/0193295.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139. В дополнительном варианте осуществления первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит VL-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140. В другом варианте осуществления первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит VH-область и VL-область, имеющие аминокислотные последовательности, приведенные под SEQ ID NO: 127+128 (VH+VL) или SEQ ID NO: 139+140 (VH+VL). В еще одном дополнительном варианте осуществления первый домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 141.

Как описано в данном документе выше, в настоящем изобретении предусмотрен вариант осуществления, где конструкция на основе антитела находится в формате, выбранном из группы, состоящей из $(scFv)_2$, scFv-однодоменного mAb, диател и олигомеров любого из вышеупомянутых форматов. Термин "находится в формате" не исключает того, что конструкция может быть дополнительно модифицирована, например, за счет прикрепления других фрагментов, описанных в данном документе, или слияния с ними. Согласно одному варианту осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и/или второй домен находятся в формате scFv. В случае scFv VH-область и VL-область расположены в порядке VH-VL или VL-VH (от N- к C-концу). Предполагается, что VH- и VL-области первого и/или второго связывающего домена связаны посредством линкера, предпочтительно пептидного линкера. Согласно одному варианту осуществления первого и/или второго домена VH-область расположена на N-конце линкера, а VL-область расположена на C-конце линкера. Другими словами, в одном варианте осуществления первого и/или второго домена scFv содержит в направлении от N-конца к C-концу: VH-линкер-VL. Кроме того, предполагается, что первый домен и второй домен конструкции на основе антитела связаны посредством линкера, предпочтительно пептидного линкера. Конструкция на основе антитела, например, может содержать домены в таком порядке (от N-конца к C-концу): первый домен - линкер - второй домен. Также возможен обратный порядок (второй домен - линкер - первый домен).

Линкеры предпочтительно представляют собой пептидные линкеры, более предпочтительно короткие пептидные линкеры. Согласно настоящему изобретению "пептидный линкер" содержит аминокислотную последовательность, которая соединяет аминокислотные последовательности одного домена с другим (вариабельным и/или связывающим) доменом (например, вариабельным доменом или связывающим доменом) конструкции на основе антитела. Необходимой технической особенностью такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует любая полимеризационная активность. К подходящим пептидным линкерам относятся линкеры, описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно использовать для прикрепления других доменов, или модулей, или областей (таких как домены, увеличивающие период полужизни) к конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Примеры применимых пептидных линкеров показаны под SEQ

ID NO: 155-168. В данном контексте "короткий" линкер имеет от 2 до 50 аминокислот, предпочтительно от 3 до 35, от 4 до 30, от 5 до 25, от 6 до 20 или от 6 до 17 аминокислот. Длина линкера, расположенного между двумя вариабельными областями одного связывающего домена, может отличаться (например, может быть больше), от длины линкера между двумя связывающими доменами. Например, длина линкера между двумя вариабельными областями одного связывающего домена может составлять от 7 до 15 аминокислот, предпочтительно от 9 до 13, а длина линкера между двумя связывающими доменами может составлять от 3 до 10 аминокислот, предпочтительно от 4 до 8. Кроме того, предполагается, что пептидные линкеры представляют собой глициновые/сериновые линкеры, например линкеры, приведенные под SEQ ID NO: 156 и 158-168. Большинство аминокислот в глициновых/сериновых линкерах выбраны из глицина и серина.

В случае применения линкера данный линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточную для обеспечения того, чтобы каждый из первого и второго доменов, независимо друг от друга, мог сохранять свою отличающуюся специфичность связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена (или две вариабельные области, образующие один связывающий домен) в конструкции на основе антитела, предусмотрены такие пептидные линкеры, которые содержат лишь небольшое число аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или меньше. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Подразумевается, что пептидный линкер с меньше чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем предпочтительными являются Gly-богатые линкеры. Линкер из "одной аминокислоты" в контексте указанного "пептидного линкера" представляет собой Gly. Другой вариант осуществления пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т. е. Gly_4Ser (SEQ ID NO: 156), или ее полимерами, т. е. $(Gly_4Ser)x$, где x представляет собой целое число, составляющее 1 или больше (например, 2 или 3). Применимые линкеры приведены под SEQ ID NO: 155-163. Характеристики указанных пептидных линкеров известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые не стимулируют образование каких-либо вторичных структур. Связь указанных доменов друг с другом может быть обеспечена, например, с помощью генной инженерии. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и их экспрессии в клетках млекопитающих или бактериях хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения конструкция на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой "конструкцию на основе одноцепочечного антитела". Также предполагается, что либо первый, либо второй, либо оба связывающих домена могут находиться в формате "одноцепочечного Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью искусственного линкера, описанного в данном документе выше, который позволяет им образовать единую белковую цепь, в которой VL- и VH-области спариваются с образованием моновалентной молекулы; см. например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Данные фрагменты антител получают с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты оценивают в отношении функции таким же образом, как полноразмерные антитела или IgG. Следовательно, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно соединенных с помощью короткого линкерного пептида. Обычно линкер богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или также треонином для обеспечения растворимости и может соединять либо N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Данный белок сохраняет специфичность оригинального иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера.

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны из уровня техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Методики, описанные для продуцирования конструкций на основе одноцепочечных антител (см., среди прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), упомянутый выше, и Little (2009), упомянутый выше), можно адаптировать для продуцирования конструкций на основе одноцепочечных антител, специфично распознающих выбранную(-ые) мишень(-и).

Двухвалентные (также называемые дивалентными) или биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты (bi-scFv или di-scFv), имеющие формат $(scFv)_2$, можно конструировать посредством связывания двух молекул scFv (например, с помощью линкеров, описанных в данном документе ранее). Связывание можно осуществлять за счет получения одной полипептидной цепи с двумя VH-областями и двумя VL-областями с получением тандемных scFv (см., например, Kufer P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, которые слишком коротки для того, чтобы два вариабельных участка складывались вместе (например, приблизительно пять аминокислот), что заставляет scFv димеризоваться. В данном случае VH и VL связывающего домена (связывающегося с антигеном-мишенью CLDN18.2 или CD3) не связаны напрямую посредством пептидного линкера. Таким образом, VH из связывающего домена для CD3, например, может быть слита с VL из связывающего домена для CLDN18.2 посредством пептидного линкера, и VH из связывающего домена для CLDN18.2 может быть слита с VL из связывающего домена для CD3 посредством такого пептидного линкера. Данный тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

Конструкции на основе антитела, обозначенные как "однодоменные антителами", содержат одну (мономерную) вариабельную область антитела, которая способна селективно связываться со специфическим антигеном, независимо от других вариабельных областей. Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител с тяжелой цепью, выявленных у верблюдовых, и они называются фрагментами V_HH. Хрящевые рыбы также имеют антитела с тяжелой цепью (IgNAR), из которых можно получать однодоменные антитела, называемые фрагментами V_{NAR}. Альтернативный подход заключается в разделении димерных вариабельных областей обычных иммуноглобулинов на мономеры с получением, таким образом, VH или VL в качестве однодоменного Ab. Хотя большинство исследований с однодоменными антителами в настоящее время основано на вариабельных областях тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами с одним вариабельным доменом. Следовательно, (однодоменное mAb)$_2$ представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух конструкций на основе однодоменных моноклональных антител, которые по отдельности выбраны из группы, содержащей VH, VL, V_HH и V_{NAR}. Линкер предпочтительно находится в виде пептидного линкера. Аналогично "scFv-однодоменное mAb" представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из по меньшей мере одного однодоменного антитела, описанного выше, и одной молекулы scFv, описанной выше. Опять же, линкер предпочтительно находится в виде пептидного линкера.

Также предусматривается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется дополнительной функцией, кроме ее функции связывания с молекулами-мишенями CLDN18.2 и CD3. В данном формате конструкция на основе антитела может быть трифункциональной или многофункциональной конструкцией на основе антитела за счет нацеливания на клетки-мишени благодаря связыванию CLDN18.2, опосредования активности цитотоксических Т-клеток благодаря связыванию CD3 и обеспечения дополнительной функции, такой как средства или домены для улучшения или увеличения периода полужизни в сыворотке крови, полностью функциональный или модифицированный константный домен Fc, опосредующий ADCC благодаря рекрутингу эффекторных клеток, метка (флуоресцентная и т. д.), терапевтическое средство, такое как токсин или радионуклид, и т. д.

Примеры средств или доменов для увеличения периода полужизни в сыворотке крови у конструкций на основе антител по настоящему изобретению включают пептиды, белки или домены белков, которые слиты или иным образом прикреплены к конструкциям на основе антител. Группа пептидов, белков или белковых доменов включает пептиды, связывающиеся с другими белками, с предпочтительным фармакокинетическим профилем в организме человека, такие как сывороточный альбумин (см. WO 2009/127691). Альтернативная концепция таких увеличивающих период полужизни пептидов включает пептиды, связывающиеся с неонатальным Fc-рецептором (FcRn, см. WO 2007/098420), которые также можно применять в конструкциях на основе антител по настоящему изобретению. Концепция прикрепления более крупных доменов белков или полных белков включает слияние с сывороточным альбумином человека, вариантами или мутантами сывороточного альбумина человека (см. WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) или их доменами, а также слияние с константной областью (Fc-доменом) иммуноглобулина и ее вариантами. Такие варианты Fc-доменов называются доменами на основе Fc и, например, могут быть оптимизированными/модифицированными, чтобы обеспечить требуемое спаривания димеров или мультимеров, исчезновения связывания Fc-рецептора (например, чтобы избежать ADCC или CDC) или по другим причинам. Дополнительная концепция увеличения периода полужизни веществ или молекул в организме человека, которая известна в данной области техники, заключается в пегилировании этих молекул (таких как конструкции на основе антитела по настоящему изобретению).

В одном варианте осуществления конструкции на основе антител согласно настоящему изобретению связываются (например, посредством пептидной связи) с партнером по слиянию (таким как белок, полипептид или пептид), например, с целью увеличения периода полужизни конструкции в сыворотке крови. Данные партнеры по слиянию могут быть выбраны из человеческого сывороточного альбумина ("HSA" или "HALB"), а также вариантов его последовательности, пептидов, связывающихся с HSA, пептидов, связывающихся с FcRn ("FcRn BP"), или конструкций, содержащих Fc-область (полученную из антитела). Иллюстративные последовательностей таких партнеров по слиянию представлены под SEQ ID NO: 170-232. В целом, партнеры по слиянию могут быть связаны с N-концом или с C-концом конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению либо напрямую (например, посредством пептидной связи), либо через пептидный линкер, такой как $(GGGGS)_n$ (где "n" представляет собой целое число 2 или больше, например 2, 3 или 4). Подходящие пептидные линкеры приведены под SEQ ID NO: 155-163.

Следовательно, предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит:

(a) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и

• необязательно His-метку, например, выбранную из SEQ ID NO: 169, 269, 270 и 271;

(b) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• необязательно пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 170 и 176-205; и

• необязательно His-метку, например, выбранную из SEQ ID NO: 169, 269, 270 и 271;

(c) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность QRFVTGHFGGLX_1PANG (SEQ ID NO: 171), где X_1 представляет собой Y или H; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 173 и SEQ ID NO: 175; и

• необязательно His-метку, например, выбранную из SEQ ID NO: 169, 269, 270 и 271;

(d) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 118;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 162;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 140, за которой следует остаток серина на C-конце;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 206; и

полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 139;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 162;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 119, за которой следует остаток серина на C-конце; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 207;

(e) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 118;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 162;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128 и SEQ ID NO: 140; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 208; и

полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 139;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 162;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 119, за которой следует остаток серина на C-конце; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 209;

(f) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 210; и

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 211;

(g) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 212; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная от N-конца:

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и

• полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 213;

(h) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и
- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 214; и

полипептид, содержащий в следующем порядке, начиная от N-конца:

- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и
- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 215;

или

(i) полипептид, содержащий в следующем порядке от N-конца к C-концу:

- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;
- пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155-163;
- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168; и
- полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 216.

Согласно другому варианту осуществления конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит (в дополнение к первому и второму домену) третий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, домен CH2 и CH3, где указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом посредством пептидного линкера. Предполагается, что указанный третий домен содержит в порядке от N-конца к C-концу: шарнир-CH2-CH3-линкер-шарнир-CH2-CH3. Аминокислотные последовательности, которые можно использовать для указанного третьего домена, приведены под SEQ ID NO: 225-232. Каждый из указанных полипептидных мономеров может иметь аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 217-224, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную этим последовательностям. В другом варианте осуществления первый и второй домены конструкции на основе антитела по настоящему изобретению слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера, который, например, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 или 163.

В рамках настоящего изобретения "шарнир" представляет собой шарнирную область IgG. Данную область можно идентифицировать по аналогии с применением нумерации по Kabat, см., например, положения 223-243 по Kabat. В рамках вышеизложенного минимальным требованием для "шарнира" являются аминокислотные остатки, соответствующие участку последовательности IgG_1 от D231 до P243 согласно нумерации по Kabat. Термины "CH2" и "CH3" относятся к константным областям 2 и 3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Данные области также можно идентифицировать по аналогии с применением нумерации по Kabat, см., например, положения 244-360 по Kabat для CH2 и положения 361-478 по Kabat для CH3. Понятно, что между иммуноглобулинами существуют некоторые отличия с точки зрения их Fc-области IgG_1, Fc-области IgG_2, Fc-области IgG_3, Fc-области IgG_4, Fc-области IgM, Fc-области IgA, Fc-области IgD и Fc-области IgE (см., например, Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). Термин Fc-область относится к последним двум константным областям тяжелой цепи IgA, IgD и IgG и последним трем константным областям тяжелой цепи IgE и IgM. Fc-область может также включать гибкий шарнир на N-конце данных доменов. В случае IgA и IgM Fc-область может включать J-цепь. В случае IgG Fc-область содержит CH2- и CH3-домены иммуноглобулина и шарнир между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы Fc-области иммуноглобулина могут варьироваться, в качестве примера Fc-часть тяжелой цепи IgG человека, содержащая функциональный шарнир, CH2- и CH3-домены, может определяться, например, как содержащая остатки от D231 (домен шарнира) до P476 (C-конец CH3-домена) или от D231 до L476 соответственно в случае IgG_4, где нумерация представляет собой нумерацию согласно Kabat.

Следовательно, конструкция на основе антитела по настоящему изобретению может содержать в порядке от N- к C-концу:

(a) первый домен;

(b) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 162 и 163;

(c) второй домен;

(d) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155, 156, 158, 159, 160, 162 и 163;

(e) первый полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2- и CH3-домен);

(f) пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 165, 166, 167 и 168; и

(g) второй полипептидный мономер третьего домена (содержащий шарнир, CH2- и

CH3-домен).

Также предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит в порядке от N- к C-концу:

- первый домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и SEQ ID NO: 141; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;
- пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 162 и 163;
- второй домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255; где пептидный линкер, содержащийся в пределах этих последовательностей и имеющий SEQ ID NO: 163, может быть заменен любой из SEQ ID NO: 155-162 и 164-168;
- пептидный линкер, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 155, 156, 158, 159, 160, 162 и 163; и
- третий домен, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 225-232.

Следовательно, в одном варианте осуществления конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит или состоит из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 143 или под SEQ ID NO: 144.

Ковалентные модификации конструкций на основе антител также включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций конструкции на основе антитела вводятся в молекулу за счет осуществления реакции между специфическими аминокислотными остатками конструкции на основе антитела с органическим дериватизирующим средством, которое способно вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или с N- или C-концевыми остатками. Дериватизация с помощью бифункциональных средств применима для сшивания конструкций на основе антител по настоящему изобретению с водонерастворимой матрицей- или поверхностью-подложкой для применения в различных способах. Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков. В качестве альтернативы данные остатки дезамидируют в умеренно кислых условиях. Любая форма данных остатков находится в пределах объема настоящего изобретения. Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкций на основе антител, включенных в объем настоящего изобретения, предусматривает изменение паттерна гликозилирования белка. Как известно в данной области техники, паттерны гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, присутствия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков, связанных с гликозилированием, обсуждаемых ниже), так и от клетки- или организма-хозяина, в которых продуцируется белок. Конкретные системы экспрессии обсуждаются ниже. Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к прикреплению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности, аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного прикрепления углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный участок гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к прикреплению одного из сахаров, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, наиболее часто к серину или треонину, хотя также могут использоваться 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление участков гликозилирования в конструкцию на основе антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае участков N-связанного гликозилирования). Изменение также можно осуществлять добавлением одного или нескольких остатков серина или треонина в исходную последовательность или заменой на них (в случае участков O-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотная последовательность конструкции на основе антитела может быть изменена за счет изменений на уровне ДНК, в частности, за счет осуществления мутаций в ДНК, кодирующей полипептид, в предварительно выбранных основаниях таким образом, чтобы создавать кодоны, которые будут транслироваться в требуемые аминокислоты.

Другим средством повышения числа углеводных фрагментов на конструкции на основе антитела является химическое или ферментативное сопряжение гликозидов с белком. Данные процедуры являются предпочтительными по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для обеспечения N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого режима сочетания сахар(-а) может(-гут) прикрепляться к: (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как в цистеине, (d) свободным гидроксильным группам, таким как в серине, треонине или гидроксипролине, (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330 и в Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходной конструкции на основе антитела, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок с помощью соединения трифторметансульфоновая кислота или эквивалентного соединения. Данная обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), при этом оставляя полипептид интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и в Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное отщепление углеводных фрагментов на полипептидах может достигаться за счет применения целого ряда эндо- и экзо-гликозидаз, описанного в Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование в потенциальных участках гликозилирования можно предотвратить за счет применения соединения туникамицин, описанного в Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных связей.

Другие модификации конструкции на основе антитела также предусмотрены в данном документе. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции на основе антитела включает связывание конструкции на основе антитела с различными небелковыми полимерами, включая полиолы, как это описано в патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, аминокислотные замены можно выполнять в различных положениях в пределах конструкции на основе антитела, например, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG).

В некоторых вариантах осуществления ковалентная модификация конструкций на основе антител по настоящему изобретению включает добавление одной или нескольких меток. Группу мечения можно присоединять к конструкции на основе антитела с помощью спейсерных плечей различной длины, чтобы уменьшить потенциальное стерическое затруднение. В данной области техники известны различные способы мечения белков и их можно применять при осуществлении настоящего изобретения. Термин "метка" или "группа мечения" относится к любой обнаруживаемой метке. В целом, метки делятся на множество классов в зависимости от анализа, в котором предполагается их обнаружение; при этом следующие примеры включают без ограничения:

a) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы, такие как радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{89}Zr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I)

b) магнитные метки (например, магнитные частицы);

c) редокс-активные фрагменты;

d) оптические красители (включая без ограничения хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут представлять собой "низкомолекулярные" флуоресцирующие средства или белковые флуоресцирующие средства;

e) ферментные группы (например, пероксидазу хрена, β-галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу);

f) биотинилированные группы;

g) заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застежки, связывающие участки для вторичных антител, домены, связывающие металлы, эпитопные метки и т. д.).

Под "флуоресцентной меткой" подразумевают любую молекулу, которая может быть обнаружена с помощью присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, желтый люцифер, Cascade BlueJ, техасский красный, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon Green, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), FITC, родамин и техасский красный (Pierce, Рокфорд, Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook от Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают без ограничения зеленый флуоресцентный белок, включая GFP из видов Renilla, Ptilosarcus или Aequorea (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., номер доступа в GenBank® U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Монреаль, Квебек, Канада H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β-галактозидазу (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) и Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, патенты США № 5292658; 5418155; 5683888; 5741668; 5777079; 5804387; 5874304; 5876995; 5925558).

Домены лейциновой застежки представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они находятся. Лейциновые застежки были первоначально идентифицированы в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), и с тех пор были найдены в целом ряде различных белков. Среди известных лейциновых застежек найдены встречающиеся в природе пептиды и их производные, которые димеризуются или тримеризуются. Примеры доменов лейциновой застежки, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке согласно PCT WO 94/10308, а лейциновая застежка, полученная из белка D легочного сурфактанта (SPD), описана в Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. Применение модифицированной лейциновой застежки, которая обеспечивает стабильную тримеризацию слитого с ней гетерологичного белка, описано в Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78.

Конструкция на основе антитела по настоящему изобретению также может содержать дополнительные домены, которые, например, применимы при выделении молекулы или связаны с адаптированным фармакокинетическим профилем молекулы. Домены, применимые для выделения конструкции на основе антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут захватываться в способе выделения, например, в колонке для выделения. Неограничивающие варианты осуществления таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Myc-метка, HAT-метка, HA-метка, TAP-метка, GST-метка, хитинсвязывающий домен (CBD-метка), мальтозасвязывающий домен (MBP-метка), Flag-метка, Strep-метка и ее варианты (например, StrepII-метка) и His-метка. Все конструкции на основе антител, раскрытые в данном документе, характеризующиеся идентифицированными CDR, могут содержать домен His-метки, который, в целом, известен как повтор последовательных остатков His в аминокислотной последовательности молекулы, например, пять остатков His (SEQ ID NO: 269) или шесть остатков His (гекса-гистидин, SEQ ID NO: 169). His-метка может быть расположена, например, на N- или C-конце конструкции на основе антитела. В одном варианте осуществления гекса-гистидиновая метка (HHHHHH) связана посредством пептидной связи с C-концом конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению.

Также предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит или состоит из полипептида, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 130 и 142, и который связан на своем N-конце или на своем C-конце с меткой для очистки белка, предпочтительно посредством пептидной связи (амидной связи). Присоединение метки для очистки белка к C-концу полипептида является предпочтительным. Предполагается, что метка для очистки белка представляет собой короткий пептид. Например, длина короткого пептида может составлять 2-30 аминокислот, 4-25 аминокислот, 5-20 аминокислот или 6-19 аминокислот. Примеры меток для очистки белка включают без ограничения AU1-эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 272), AU5-эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 273), T7-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 274), V5-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 275), B-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 276), E2-эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 277), FLAG-эпитоп/FLAG-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 278), Glu-Glu-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 279 или 280), HA-метку, гистидиновую аффинную метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 281), HSV-эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 282), KT3-

эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 283), Myc-эпитоп (например, как приведено под SEQ ID NO: 284), полиаргининовую метку (5-6 остатков Arg), полиаспартатную метку (5-16 остатков Asp), полигистидиновую метку(2-10 остатков His, обычно 6 остатков His, см., например, SEQ ID NO: 169 и 269-271), полифенилаланиновую метку (обычно 11 остатков Phe), S1-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 285), S-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 286), Strep-метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 287 или 288), универсальную метку (например, как приведено под SEQ ID NO: 289), VSV-G (например, как приведено под SEQ ID NO: 290), белок C (например, как приведено под SEQ ID NO: 291), а также белок A. Предпочтительной является гистидиновая метка, в частности, 6x His-метка (SEQ ID NO: 169). Следовательно, дополнительно предполагается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению состоит из полипептида, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 130 и 142, и который связан на своем C-конце с 6xHis-меткой посредством пептидной связи. Вариант осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению имеет аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 131 или SEQ ID NO: 143.

Т-клетки или Т-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов (которые сами по себе являются типом лейкоцитов), который играет центральную роль в клеточноопосредованном иммунитете. Существует несколько подгрупп Т-клеток, каждая из которых имеет свою функцию. Т-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как B-клетки и NK-клетки, по присутствию Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки. TCR отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC), и состоит из двух разных белковых цепей. У 95% Т-клеток TCR состоит из альфа(α)- и бета(β)-цепи . Когда TCR вступает в контакт с антигенным пептидом и молекулой MHC (комплекс пептид/ молекула MHC), происходит активация Т-лимфоцита посредством серии биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, корецепторами, специализированными адапторными молекулами и активированными или высвобожденными транскрипционными факторами.

Конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки. "CD3" (кластер дифференцировки 3) представляет собой корецептор Т-клетки, состоящий из четырех цепей. У млекопитающих комплекс белка CD3 содержит CD3γ(гамма)-цепь, CD3δ(дельта)-цепь и две CD3ε(эпсилон)-цепи. Эти четыре цепи связываются с Т-клеточным рецептором (TCR) и так называемой ζ(дзета)-цепью с образованием "комплекса Т-клеточного рецептора" и генерацией сигнала активации в Т-лимфоцитах. CD3γ(гамма)-, CD3δ(дельта)- и CD3ε(эпсилон)-цепи представляют собой близкородственные белки поверхности клетки из суперсемейства иммуноглобулинов, каждый из которых содержит один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), который является необходимым для функции сигнального пути TCR. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, который расположен на хромосоме 11.

Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством рекрутинга Т-клеток за счет конструкции на основе антитела, которая связывается с CD3 на Т-клетке и с белком-мишенью на клетке-мишени, обычно включает образование цитолитических синапсов и доставку перфорина и гранзимов. Вступившие в контакт Т-клетки способны последовательно осуществлять лизис клеток-мишеней и на них не влияют механизмы уклонения от иммунологического надзора, противодействующие процессингу и презентации пептидных антигенов или клональной дифференцировке Т-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованная конструкциями на основе антител к CLDN18.2xCD3, может быть измерена различными способами. См. пример 7. "Полумаксимальная эффективная концентрация" (EC_{50}) обычно используется как показатель эффективности биологически активной молекулы, такой как конструкция на основе антитела по настоящему изобретению. Она может быть выражена в молярных единицах. В данном случае измерения цитотоксичности значение EC_{50} относится к концентрации конструкции на основе антитела, индуцирующей половинный цитотоксический ответ (лизис клеток-мишеней) между исходным уровнем и максимумом. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут представлять собой, например, стимулированные обогащенные CD8-положительные Т-клетки человека или нестимулированные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека. Как правило, можно ожидать, что значение EC_{50} будет ниже, когда в качестве эффекторных клеток используются стимулированные/обогащенные CD8+ Т-клетки по сравнению с нестимулированными PBMC. Если клетки-мишени происходят из организма макака, или экспрессируют CLDN18.2 макака, или трансфицированы им, эффекторные клетки также должны происходить от организма макака, как, например, линия Т-клеток макака, например, 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать CLDN18.2, такой как CLDN18.2 человека или макака, на поверхности клетки. Предпочтительно клетки-мишени должны экспрессировать по меньшей мере внеклеточную(-ые) петлю(-и) CLDN18.2, такую(-ие) как петля 1 и/или петля 2 CLDN18.2, на поверхности клетки. Клетки-мишени могут представлять собой линию клеток (таких как CHO), стабильно или временно трансфицированных CLDN18.2, например, CLDN18.2 человека или макака. В качестве альтернативы клетки-мишени могут представлять собой линию CLDN18.2-положительную клеток с естественной экспрессией, такую как линии клеток рака желудка человека SNU-601 или SNU-620, или также SNU-16, NUGC, NUG-C4, GSU или IM95. Обычно ожидается, что значения EC_{50} будут ниже при использовании клеток-мишеней, которые экспрессируют более высокие уровни CLDN18.2 на поверхности клетки по сравнению с клетками-мишенями, для которых характерен более низкий уровень экспрессии мишени.

Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) в анализе цитотоксичности обычно составляет приблизительно 10:1, но также может варьироваться. Цитотоксическую активность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 можно измерить с помощью анализа высвобождения хрома-51 (например, при времени инкубации приблизительно 18 часов) или с помощью анализа цитотоксичности на основе FACS (например, при времени инкубации приблизительно 48 часов). Также предусмотрены модификации времени инкубации (цитотоксической реакции). В данной области техники хорошо известны другие способы измерения цитотоксичности, и они включают анализы с MTT или MTS, анализы на основе АТФ, включая биолюминесцентные анализы, анализ с сульфородамином B (SRB), анализ с WST, оценку клоногенности и технологию ECIS.

Согласно одному варианту осуществления цитотоксическую активность, опосредованная конструкциями на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению, измеряют в анализе цитотоксичности на основе клеток. Ее также можно измерить в анализе высвобождения хрома-51. Предполагается, что значение EC_{50} для конструкций на основе антител по настоящему изобретению составляет ≤300 пМ, ≤280 пМ, ≤260 пМ, ≤250 пМ, ≤240 пМ, ≤220 пМ, ≤200 пМ, ≤180 пМ, ≤160 пМ, ≤150 пМ, ≤140 пМ, ≤120 пМ, ≤100 пМ, ≤90 пМ, ≤80 пМ, ≤70 пМ, ≤60 пМ, ≤50 пМ, ≤40 пМ, ≤30 пМ, ≤20 пМ, ≤15 пМ, ≤10 пМ или ≤5 пМ.

Указанные выше значения EC_{50} могут быть получены в различных анализах и в различных условиях. Например, когда в качестве эффекторных клеток используются PBMC человека, а в качестве клеток-мишеней используются клетки, трансфицированные CLDN18.2, такие как клетки CHO, предполагается, что значение EC_{50} для конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 составляет ≤500 пМ, ≤400 пМ, ≤300 пМ, ≤280 пМ, ≤260 пМ, ≤250 пМ, ≤240 пМ, ≤220 пМ, ≤200 пМ, ≤180 пМ, ≤160 пМ, ≤150 пМ, ≤140 пМ, ≤120 пМ, ≤100 пМ, ≤90 пМ, ≤80 пМ, ≤70 пМ, ≤60 пМ, ≤50 пМ, ≤40 пМ, ≤30 пМ, ≤20 пМ, ≤15 пМ, ≤10 пМ или ≤5 пМ. Когда в качестве эффекторных клеток используются PBMC человека, и когда клетки-мишени представляют собой линию CLDN18.2-положительных клеток, такую как SNU-601 или SNU-620, предполагается, что значение EC_{50} для конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 составляет ≤300 пМ, ≤280 пМ, ≤260 пМ, ≤250 пМ, ≤240 пМ, ≤220 пМ, ≤200 пМ, ≤180 пМ, ≤160 пМ, ≤150 пМ, ≤140 пМ, ≤120 пМ, ≤100 пМ, ≤90 пМ, ≤80 пМ, ≤70 пМ, ≤60 пМ, ≤50 пМ, ≤40 пМ, ≤30 пМ, ≤20 пМ, ≤15 пМ, ≤10 пМ или ≤5 пМ.

Согласно одному варианту осуществления конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению не индуцируют/не опосредуют лизис или практически не индуцируют/не опосредуют лизис клеток, которые не экспрессируют CLDN18.2 на своей поверхности (CLDN18.2-отрицательные клетки), такие как клетки CHO. Термин "не индуцирует лизис", "практически не индуцирует лизис", "не опосредует лизис" или "практически не опосредует лизис" означает, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению не индуцирует и не опосредует лизис CLDN18.2-

отрицательных клеток на более чем 30%, предпочтительно на не более чем 20%, более предпочтительно на не более чем 10%, особенно предпочтительно на не более чем 9%, 8%, 7%, 6% или 5%, при этом лизис CLDN18.2-экспрессирующих целевых клеток (например, клеток, трансформированных или трансфицированных CLDN18.2 или линии клеток с естественной экспрессией, например, линии клеток рака желудка человека SNU-601 или SNU-620) принимается за 100%. Это обычно соответствует концентрациям конструкции на основе антитела, составляющим не более 500 нМ. Измерение лизиса клеток представляет собой традиционную методику. Более того, в данном описании приведены конкретные инструкции для измерения лизиса клеток.

Отличие в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформами отдельных конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 называют "разрыв в эффективности". Данный разрыв в эффективности можно рассчитать, например, как соотношение значений EC_{50} для мономерных и димерных форм молекулы. В одном способе определения данного разрыва проводят 18-часовой анализ высвобождения хрома-51 или 48-часовой анализ цитотоксичности на основе FACS, как описано ниже (примеры 7.1 и 7.2), с мономером и димером очищенной конструкции на основе антитела. Эффекторные клетки представляют собой стимулированные обогащенные CD8+ Т-клетки человека или нестимулированные PBMC человека. Клетки-мишени представляют собой клетки CHO, трансфицированные huCLDN18.2. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) составляет 10:1. Разрыв в эффективности для конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению составляет предпочтительно ≤ 5, более предпочтительно ≤ 4, еще более предпочтительно ≤ 3, еще более предпочтительно ≤ 2 и наиболее предпочтительно ≤ 1.

Первый и/или второй домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно характеризуются межвидовой специфичностью для представителей отряда приматов класса млекопитающих, таких как макаки. CD3-связывающие домены, для которых характерна межвидовая специфичность, описаны, например, в WO 2008/119567. Согласно одному варианту осуществления второй домен в дополнение к связыванию с CD3 человека будет также связываться с CD3 приматов, включая (без ограничения) приматов Нового Света (таких как Callithrix jacchus, Saguinus Oedipus или Saimiri sciureus), приматов Старого Света (таких как бабуины и макаки), гиббонов, орангутанов и отличных от человека представителей homininae. Предполагается, что второй домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, также связывается с по меньшей мере CD3 макака. Предпочтительно макак представляет собой Macaca fascicularis. Также предусмотрен вид Macaca mulatta (макак-резус). Одна конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит первый домен, который связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени, и второй домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки и с по меньшей мере CD3 макака.

В одном варианте осуществления разрыв в аффинности для конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению при связывании с CD3 макака по сравнению с CD3 человека [KD maCD3: KD huCD3] (как определено, например, с помощью BiaCore или анализа по Скэтчарду) составляет от 0,01 до 100, предпочтительно от 0,1 до 10, более предпочтительно от 0,2 до 5, более предпочтительно от 0,3 до 4, еще более предпочтительно от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5 и наиболее предпочтительно от 0,5 до 1. См. пример 3.

Второй домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CD3. Более предпочтительно, он связывается с CD3 на поверхности T-клетки. Кроме того, предполагается, что второй домен связывается с CD3 человека, предпочтительно с CD3 человека на поверхности T-клетки. Также предполагается, что второй домен связывается с CD3-эпсилон. Более предпочтительно, он связывается с CD3-эпсилон человека, например, с CD3-эпсилон человека на поверхности T-клетки. Предпочтительная аминокислотная последовательность внеклеточного домена CD3-эпсилон человека приведена под SEQ ID NO: 256.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения второй домен конструкции на основе антитела связывается с CD3-эпсилон человека (или CD3-эпсилон человека на поверхности T-клетки) и с CD3-эпсилон Callithrix jacchus или Saimiri sciureus. Также предполагается, что второй домен связывается с внеклеточным эпитопом CD3-эпсилон, предпочтительно с внеклеточным эпитопом CD3-эпсилон человека. Также предполагается, что второй домен связывается с внеклеточным эпитопом CD3-эпсилон цепи человека и Macaca. Один предпочтительный эпитоп CD3-эпсилон содержится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена CD3-эпсилон человека (см. SEQ ID NO: 257). Еще более конкретно, эпитоп содержит по меньшей мере аминокислотную последовательность Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. Callithrix jacchus представляет собой вид приматов Нового Света, относящийся к семейству Callitrichidae, тогда как Saimiri sciureus представляет собой вид приматов Нового Света, относящийся к семейству Cebidae. Связывающие вещества, обладающие такими характеристиками, подробно описаны в WO 2008/119567.

Антитела или конструкции на основе биспецифических антител, направленные против CD3 человека или конкретно против CD3-эпсилон, известны в данной области техники, и последовательности их CDR, VH и VL могут служить в качестве основы для второго связывающего домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Например, Kung et al. сообщали в 1979 году о разработке OKT3 (Ortho Kung T3), первого mAb, распознающего CD3 (в частности, эпсилон-цепь CD3) на поверхности T-клеток человека. OKT3 (муромонаб) был первым моноклональным антителом мышиного происхождения, которое стало доступным для терапии у людей. Более новые моноклональные антитела к CD3 включают отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), форалумаб и визилизумаб, все из которых нацеливаются на эпсилон-цепь CD3. Конструкции на основе биспецифических антител, направленные против (раковой) мишени и CD3, также разрабатываются и проходят (до)клинические исследования, и их

CD3-связывающий домен (CDR, VH, VL) может служить в качестве основы для второго связывающего домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Примеры включают без ограничения блинатумомаб, солитомаб (MT110, AMG 110), катумаксомаб, дувортуксизумаб, эртумаксомаб, мосунетузумаб, FBTA05 (Bi20, TPBs05), CEA-TCB (RG7802, RO6958688), AFM11 и MGD006 (S80880). Другие примеры CD3-связывающих доменов раскрыты, например, в US 7994289 B2, US 7728114 B2, US 7381803 B1, US 6706265 B1.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предусмотрено, что второй домен, который связывается с CD3 на поверхности T-клетки, содержит VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

(a) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 37, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 38, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 39;

(b) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 82, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 83, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 84, и

(c) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 100, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 101, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 102.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению также предусмотрено, что второй домен, который связывается с CD3 на поверхности T-клетки, содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 31, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 32, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 33;

(b) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 40, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 41, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 42;

(c) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 49, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 50, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 51;

(d) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 58, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 59, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 60;

(e) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 67, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 68, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 69;

(f) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 76, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 77, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 78;

(g) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 85, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 86, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 87;

(h) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 94, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 95, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 96;

(i) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 103, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 104, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 105, и

(j) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 112, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 113, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 114.

Кроме того, для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предусмотрено, что второй домен, который связывается с CD3, содержит VL-область, которая содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, и VH-область, которая содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

(a) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 28, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 29, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 30, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 31, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 32, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 33;

(b) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 37, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 38, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 39, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 40, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 41, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 42;

(c) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 46, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 47, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 48, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 49, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 50, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 51;

(d) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 55, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 56, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 57, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 58, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 59, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 60;

(e) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 64, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 65, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 66, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 67, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 68, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 69;

(f) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 73, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 74, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 75, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 76, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 77, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 78;

(g) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 82, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 83, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 84, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 85, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 86, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 87;

(h) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 91, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 92, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 93, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 94, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 95, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 96;

(i) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 100, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 101, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 102, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 103, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 104, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 105, и

(j) CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 109, CDR-L2, приведенной под SEQ ID

NO: 110, CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 111, CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 112, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 113, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 114.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предусмотрено, что второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, содержит VL-область, выбранную из группы, состоящей из VL-области, приведенной под любой из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 и SEQ ID NO: 235.

Также предусмотрено, что второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, содержит VH-область, выбранную из группы, состоящей из VH-области, приведенной под любой из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244 и SEQ ID NO: 245.

Более предпочтительно конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, содержащим VL-область и VH-область, выбранные из группы, состоящей из:

(a) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 35 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 34 или 236;

(b) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 44 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 43 или 237;

(c) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 53 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 52 или 238;

(d) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 62 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 61 или 239;

(e) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 71 или 234, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 70 или 240;

(f) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 80 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 79 или 241;

(g) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 89 или 234, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 88 или 242;

(h) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 98 или 233, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 97 или 243;

(i) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 107 или 235, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 106 или 244;

(j) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 116 или 235, и VH-области, приведенной под SEQ ID NO: 115 или 245; и

(k) VL-области, приведенной под SEQ ID NO: 119, и VH-области, приведенной под

SEQ ID NO: 118.

Предпочтительный вариант осуществления описанной выше конструкции на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3 на поверхности T-клетки, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 и 255.

Также предполагаются модификации аминокислотных последовательностей у конструкций на основе антител, описанных в данном документе. Например, может потребоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств конструкции на основе антитела. Варианты аминокислотных последовательностей у конструкций на основе антител получают за счет пептидного синтеза или за счет введения соответствующих нуклеотидных изменений в молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую конструкции на основе антител. Все описанные ниже модификации аминокислотной последовательности должны приводить к конструкции на основе антитела, которая сохраняет требуемую биологическую активность немодифицированной исходной молекулы (такую как связывание с CLDN18.2 и с CD3, индуцирование цитотоксичности против CLDN18.2-положительных клеток-мишеней).

Термины "аминокислота" или "аминокислотный остаток" обычно относятся к аминокислоте, имеющей определение, принятое в данной области техники, такой как аминокислота, выбранная из группы, состоящая из аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеина (Cys или C); глутамина (Gln или Q); глутаминовой кислоты (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y) и валина (Val или V), хотя при необходимости можно применять модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Существует четыре основных класса аминокислот, определяемых разными боковыми цепями:

(1) неполярные и нейтральные (незаряженные): Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val;

(2) полярные и нейтральные (незаряженные): Asn, Cys (слабо полярная), Gln, Ser, Thr, Trp (слабо полярная), Tyr;

(3) кислые и полярные (отрицательно заряженные): Asp и Glu;

(4) основные и полярные (положительно заряженные): Arg, His, Lys.

Гидрофобные аминокислоты можно разделить в зависимости от того, имеют ли они алифатические или ароматические боковые цепи. Phe и Trp (будучи высокогидрофобными), Tyr и His (менее гидрофобными) классифицируются как ароматические аминокислоты. Строго говоря, алифатическая означает, что боковая цепь содержит только атомы водорода и углерода. Согласно такому строгому определению аминокислотами с алифатическими боковыми цепями являются аланин, изолейцин, лейцин (также норлейцин), пролин и валин. Боковая цепь аланина очень короткая, что означает, что она не особенно гидрофобна, а пролин имеет необычную геометрическую структуру, которая придает ему особое значение для белков. Часто удобно рассматривать метионин в той же категории, что и изолейцин, лейцин и валин, хотя он также содержит атом серы. Объединяющий признак заключается в том, что эти аминокислоты содержат в основном нереакционноспособные и гибкие боковые цепи. Аминокислоты аланин, цистеин, глицин, пролин, серин и треонин часто объединены вместе по той причине, что все они имеют небольшой размер. Gly и Pro могут влиять на ориентацию цепи.

Аминокислотные модификации включают, например, делеции остатков, вставки остатков и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях конструкций на основе антител. Для получения конечной конструкции на основе антитела осуществляют любую комбинацию делеции, вставки и/или замены при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например биологическая активность немодифицированной исходной молекулы (например, связывание с CLDN18.2 и CD3, индуцирующая цитотоксичность в отношении CLDN18.2-положительных клеток-мишеней). Изменения в аминокислотах также могут изменять посттрансляционные процессы, которым подвергаются конструкции на основе антител, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования.

Например, в каждой из CDR (разумеется, в зависимости от их соответствующей длины) может происходить вставка, делеция и/или замена 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот, тогда как в каждой из FR может происходить вставка, делеция и/или замена 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот. Вставки аминокислотной последовательности также включают добавления на N-конце и/или C-конце аминокислот в диапазоне длины, например, от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков для полипептидов, содержащих более 10, например сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Инсерционный вариант конструкции на основе антитела по настоящему изобретению включает слияние полипептида, который увеличивает или удлиняет период полужизни в сыворотке крови конструкции на основе антитела с N-концом или C-концом конструкции на основе антитела. Также возможно, что такая вставка происходит внутри конструкции на основе антитела, например между первым и вторым доменом.

Сайты, представляющие наибольший интерес для аминокислотных модификаций, в частности для аминокислотных замен, включают гипервариабельные области, в частности индивидуальные CDR тяжелой и/или легкой цепи, но также возможны изменения FR в тяжелой и/или легкой цепи. Замены могут представлять собой консервативные замены, описанные в данном документе. В CDR предпочтительно могут быть заменены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, тогда как в каркасных областях (FR) могут быть заменены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот, в зависимости от длины CDR или FR соответственно. Например, если последовательность CDR охватывает 6 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух или трех из этих аминокислот. Аналогично, если последовательность

CDR охватывает 15 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух, трех, четырех, пяти или шести из этих аминокислот.

Применимый способ идентификации определенных остатков или областей в конструкциях на основе антител, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", описанный в Cunningham B.C. and Wells J.A. (Science. 1989 Jun 2;244(4908):1081-5). В данном случае идентифицируют остаток или группу остатков в пределах конструкции на основе антитела (например, заряженные остатки, такие как Arg, His, Lys, Asp и Glu) и заменяют их нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), влияя на взаимодействие соответствующей аминокислоты (аминокислот) с эпитопом белка-мишени. Аланиновое сканирование представляет собой методику, используемую для определения вклада конкретного остатка в стабильность или функцию данного белка. Применение аланина обусловлено наличием в нем небольшой, химически инертной метильной функциональной группы, которая, тем не менее, имитирует предпочтения к вторичной структуре, которыми обладают многие другие аминокислоты. В тех случаях, когда требуется сохранить размер остатков, подвергнутых мутации, иногда можно использовать крупные аминокислоты, такие как валин или лейцин. Эта методика также может быть применима для определения того, играет ли боковая цепь определенного остатка значительную роль в биологической активности. Аланиновое сканирование обычно выполняется путем сайт-направленного мутагенеза или случайным образом путем создания библиотеки ПЦР. Кроме того, были разработаны вычислительные способы оценки термодинамических параметров на основе теоретических замещений аланина. Данные могут быть проверены посредством ИК, ЯМР-спектроскопии, математических способов, биологических анализов и т. д.

Затем те местоположения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам (что определено, например, посредством аланинового сканирования), можно корректировать путем введения дополнительных или других вариантов в участках замен или для них. Таким образом, хотя участок для введения варианта аминокислотной последовательности определяют предварительно, собственно природа мутации не нуждается в предварительном определении. Например, чтобы проанализировать или оптимизировать характеристики мутации в данном сайте, можно провести сканирующий аланином или случайный мутагенез в кодоне-мишени или участке-мишени и провести скрининг экспрессируемых вариантов конструкции на основе антитела в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Методики осуществления мутаций с замещением в предварительно определенных участках в ДНК с известной последовательностью, хорошо известны, например, это мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводят, например, с использованием анализов активности связывания антигена (например, CLDN18.2 или CD3) и/или цитотоксической активности.

Как правило, если аминокислоты заменены в одной или нескольких или во всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, то предпочтительно, чтобы полученная таким образом последовательность "с заменами" была на по меньшей мере 60% или 65%, более предпочтительно на 70% или 75%, еще более предпочтительно на 80% или 85% и особенно предпочтительно на 90% или 95% идентична/гомологична «исходной» или «родительской» последовательности CDR. Это означает, что степень идентичности/гомологии между исходной и замещенной последовательностями зависит от длины CDR. Например, CDR, содержащая всего 5 аминокислот и содержащая одну аминокислотную замену, на 80% идентична «исходной» или «родительской» последовательности CDR, в то время как CDR, содержащая всего 10 аминокислот и содержащая одну аминокислотную замену, на 90% идентична «исходной» или «родительской» последовательности CDR. Соответственно, замещенные CDR в конструкции на основе антитела по настоящему изобретению могут иметь разные степени идентичности с их исходными последовательностями, например, CDRL1 может иметь 80%, тогда как CDRL3 может иметь 90% гомологии. Те же соображения применимы к каркасным областям и ко всем VH- и VL-областям.

«Вариант CDR» представляет собой CDR с определенной гомологией последовательности, сходством или идентичностью с родительской CDR по настоящему изобретению и разделяет биологическую функцию с родительской CDR, в том числе по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% или 99% специфичности и/или активности родительской CDR. Как правило, аминокислотная гомология, сходство или идентичность между отдельными вариантными CDR составляет по меньшей мере 60% от родительских последовательностей, представленных в данном документе, и чаще всего с повышением гомологии, сходства или идентичности на по меньшей мере 65% или 70%, предпочтительно по меньшей мере 75% или 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% и наиболее предпочтительно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и почти 100%. То же самое применимо к «варианту VH» и «варианту VL». Согласно одному варианту осуществления варианты последовательности в «варианте VH» и/или «варианте VL» не распространяются на CDR. Таким образом, настоящее изобретение направлено на конструкцию на основе антитела, определенную в данном документе, содержащую последовательности VH и VL, имеющие определенную гомологию последовательностей (см. выше) с конкретными последовательностями, определенными в данном документе («родительские» VH и VL), где последовательности CDR на 100% идентичны определенным последовательностям CDR, что определено в данном документе («родительские» CDR).

Предпочтительные замены (замещения) представляют собой консервативные замены. Однако предусматривается любая замена (в том числе неконсервативные замены или одна или несколько из "иллюстративных замен", перечисленных в таблице 1 ниже) при условии, что конструкция на основе антитела сохраняет свою способность к связыванию с CLDN18.2 посредством первого домена и с CD3 или CD3-эпсилон посредством второго домена, и/или предполагается, что его последовательности CDR, FR, VH и/или VL характеризуются степенью идентичности к исходной или родительской последовательности, составляющей по меньшей мере 60% или 65%, более предпочтительно 70% или 75%, еще более предпочтительно 80% или 85% и особенно предпочтительно 90% или 95%.

Консервативная замена (также называемая консервативной мутацией или консервативной заменой) представляет собой замену аминокислоты, при которой данная аминокислота заменяется другой аминокислотой с аналогичными биохимическими свойствами (например, заряд, гидрофобность, размер). Консервативные замены в белках часто оказывают меньшее влияние на функцию белков, чем неконсервативные замены. Консервативные замены представлены в таблице 1. Иллюстративные консервативные замены показаны как "иллюстративные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда можно вносить более существенные изменения, дополнительно описанные в данном документе с привязкой к классам аминокислот, а продукты исследовать в отношении необходимой характеристики.

Таблица 1. Аминокислотные замены (аа=аминокислота)

Исходная аа	**Консервативные замены**	**Иллюстративные замены**
Ala (A)	Небольшая аа	Gly, Ser, Thr
Arg (R)	Полярная аа, в частности Lys	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Полярная аа, в частности Asp	Asp, Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu или другая полярная аа, в частности Asn	Glu, Asn
Cys (C)	Небольшая аа	Ser, Ala
Gln (Q)	Полярная аа, в частности Glu	Glu, Asn
Glu (E)	Asp или другая полярная аа, в частности Gln	Asp, Gln
Gly (G)	Небольшая аа, например Ala	Ala
His (H)		Asn, Gln, Arg, Lys, Tyr
Ile (I)	Гидрофобная, в частности алифатическая аа	Ala, Val, Met, Leu, Phe
Leu (L)	Гидрофобная, в частности алифатическая аа	Норлейцин, Ile, Ala, Val, Met
Lys (K)	Полярная аа, в частности Arg	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Гидрофобная, в частности алифатическая аа	Leu, Ala, Ile, Val, Phe

Phe (F)	Ароматическая или гидрофобная аа, в частности Tyr	Tyr, Trp, Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Небольшая аа	Ala
Ser (S)	Полярная или небольшая аа, в частности Thr	Thr
Thr (T)	Полярная аа, в частности Ser	Ser
Trp (W)	Ароматическая аа	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Ароматическая аа, в частности Phe	Phe, Trp, Thr, Ser
Val (V)	Гидрофобная, в частности алифатическая аа	Leu, Ile, Ala, Met, Phe

Существенные модификации биологических свойств конструкции на основе антитела по настоящему изобретению осуществляют путем выбора замен, значительно различающихся по своему эффекту в отношении поддержания (a) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в участке-мишени или (c) объема боковой цепи. Неконсервативные замены обычно влекут за собой замену представителя одного из указанных выше классов аминокислот (например, полярных, нейтральных, кислотных, основных, алифатических, ароматических, небольших…) на другой класс. Любой остаток цистеина, не принимающий участия в поддержании надлежащей конформации конструкции на основе антитела, можно заменять, как правило, серином для улучшения устойчивости конструкции на основе антитела к окислению.

Для аминокислотных последовательностей идентичность последовательности, гомология и/или подобие определяются посредством стандартных методик, известных в данной области техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательности по Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания для нахождения идентичности последовательностей Нидлмана-Вунша (J Mol Biol. 1970 Mar;48(3):443-53), способ поиска сходства Пирсона-Липмана (Proc Natl Acad Sci USA. 1988 Apr;85(8):2444-8), компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин), программу Best Fit sequence, описанную в Devereux et al. (Nucleic Acids Res.1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95), предпочтительно с использованием стандартных параметров или визуально. Предполагается, что процент идентичности рассчитывается в FastDB на основе следующих параметров: штраф за несоответствие 1; штраф за открытие гэпа 1; штраф за длину гэпа 0,33 и штраф за присоединение 30. См. также "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером используемого алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей на основе группы родственных последовательностей с применением последовательных попарных выравниваний. Он также может построить дерево, показывающее кластеризационные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощенный способ прогрессивного выравнивания Фенга и Дулитла (J Mol Evol.1987;25(4):351-60); способ аналогичен описанному Хиггинсом и Шарпом (Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-3). Используемые параметры PILEUP включают стандартный штраф за введение гэпа 3,00, стандартный штраф за удлинение гэпа 0,10 и оцениваемые концевые гэпы.

Другим примером используемого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al. (J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.); Altschul et al., (Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402) и Karlin and Altschul (Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 15;90(12):5873-7). Особенно часто используемой программой BLAST является программа WU-Blast-2, которая была получена из Altschul et al., (Methods Enzymol. 1996; 266:460-80). В WU-Blast-2 используется несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены стандартные значения. Корректируемые параметры установлены со следующими значениями: длина перекрывания=1, доля перекрывания=0,125, пороговое значение длины слова (T)= II. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительный применимый алгоритм представляет собой BLAST с введением гэпов согласно Altschul. et al. (Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402). В BLAST с введением гэпов используются баллы замены BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двух хитов для инициации удлинений без введения гэпов придает удлинению гэпа k значение 10+k; Xu установлен на 16, и Xg установлен на 40 для стадии поиска в базе данных и 67 для завершающей стадии алгоритмов. Выравнивания с введением гэпа запускаются с помощью балла, соответствующего приблизительно 22 битам.

В данном контексте термин "процент (%) идентичности/гомологии/подобия последовательности нуклеиновой кислоты" по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты конструкций на основе антитела, определенных в данном документе, определяется как процент нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности конструкции на основе антитела. В одном способе выравнивания двух последовательностей и за счет этого определения их гомологии используется модуль BLASTN программы WU-Blast2 со стандартными параметрами, с диапазоном перекрытия и фракцией перекрытия, заданными 1 и 0,125 соответственно. Обычно в нуклеиновой кислоте гомология, сходство или идентичность между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные вариантные CDR, и нуклеотидными последовательностями, приведенными в данном документе, составляют по меньшей мере 60% и, что более характерно, с возрастающими гомологией, подобием или идентичностью, составляющими по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% и практически 100%. Опять же, то же самое относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей "вариант VH" и/или "вариант VL".

В одном варианте осуществления процент идентичности с зародышевой линией человека конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению или с первым или вторым доменом (связывающие домены) таких конструкций на основе антител составляет ≥ 70% или ≥ 75%, более предпочтительно ≥ 80% или ≥ 85%, даже более предпочтительно ≥ 90% и наиболее предпочтительно ≥ 91%, ≥ 92%, ≥ 93%, ≥ 94%, ≥ 95% или даже ≥ 96%. Считается, что идентичность с генными продуктами антитела зародышевой линии человека является важным фактором для снижения риска того, что терапевтические белки будут вызывать иммунный ответ против лекарственного средства у пациента в ходе лечения. Hwang W.Y. и Foote J. (Methods. 2005 May;36(1):3-10) демонстрируют, что уменьшение количества частей, не являющихся человеческими, в конструкциях на основе антител, являющихся лекарственными средствами, приводит к снижению риска индуцирования выработки антител к лекарственным средствам у пациентов в ходе лечения. При сравнении достаточного количества клинически оцененных лекарственных средств на основе антител и соответствующих данных по иммуногенности была выявлена тенденция, демонстрирующая, что гуманизация вариабельных областей конструкций на основе антител/антитела делает белки менее иммуногенными (в среднем для 5,1% пациентов), чем конструкций на основе антител/антитела, несущих неизмененные вариабельные области, не являющиеся человеческими (в среднем для 23,59% пациентов). Следовательно, для белковых терапевтических средств на основе вариабельных областей и в форме конструкций на основе антител необходима большая степень идентичности с последовательностями человека. С целью определения идентичности зародышевой линии можно проводить выравнивание V-областей VL с аминокислотными последовательностями V-сегментов и J-сегментов зародышевой линии человека (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/), используя программное обеспечение Vector NTI, и рассчитывать аминокислотную последовательность путем деления идентичных аминокислотных остатков на общее число аминокислотных остатков VL в процентах. То же самое можно осуществлять в отношении VH-сегментов (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/) за исключением того, что CDR3 VH может быть исключена вследствие высокой степени разнородности и отсутствия партнеров по выравниванию среди CDR3 VH зародышевой линии человека. Затем можно использовать рекомбинантные технологии для повышения идентичности последовательностей с генами антитела зародышевой линии человека.

В дополнительном варианте осуществления конструкции на основе антител по настоящему изобретению проявляют высокие выходы мономеров в стандартных условиях исследовательского масштаба, например, в стандартном двухстадийном способе очистки. Предполагается, что выход мономеров конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению составляет ≥ 0,25 мг/л супернатанта (SN), предпочтительно ≥ 0,5 мг/л SN, более предпочтительно ≥ 1 мг/л SN, даже более предпочтительно ≥ 2 мг/л SN и наиболее предпочтительно ≥ 3 мг/л SN. Было показано, что выход конструкции на основе антитела, обозначенной "CL-1 x I2C-6His", составляет 4,1 мг/л супернатанта, а выход конструкции на основе антитела, обозначенной "CL-1 x I2C-scFc", составляет 36,5 мг/л супернатанта.

Аналогично можно определить выход изоформ димерной конструкции на основе антитела и, следовательно, процентную долю мономера (то есть мономер: (мономер+димер)) конструкций на основе антител. Выход мономерных и димерных конструкций на основе антител и рассчитанная процентная доля мономеров могут, например, быть достигнуты на стадии очистки культурального супернатанта посредством SEC при стандартизированном получении в исследовательских масштабах в роллерных флаконах. Согласно одному варианту осуществления процентное содержание мономеров конструкций на основе антитела по настоящему изобретению составляет ≥ 80%, более предпочтительно ≥ 85%, даже более предпочтительно ≥ 90% и наиболее предпочтительно ≥ 95%.

Согласно одному варианту осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению характеризуются стабильностью в плазме крови (соотношением EC_{50} с плазмой крови и EC_{50} без плазмы крови), составляющей ≤ 5 или ≤ 4, более предпочтительно ≤ 3,5 или ≤ 3, даже более предпочтительно ≤ 2,5 или ≤ 2 и наиболее предпочтительно ≤ 1,5 или ≤ 1. Стабильность конструкции на основе антитела в плазме может быть исследована путем инкубирования очищенной конструкции в плазме крови человека при 37°C в течение 24-96 часов, например при концентрации 2-20 мкг/мл с последующим определением EC_{50} в 18-часовом высвобождении хрома-51 или в 48-часовом FACS-анализе цитотоксичности (анализах, например, описанных в примерах 7.1 и 7.2). Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут представлять собой стимулированные обогащенные CD8-положительные T-клетки человека или нестимулированные PBMC человека. Клетками-мишенями могут быть, например, клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) может равняться 10:1. Начальная концентрация конструкций на основе антител в анализе цитотоксичности может составлять 0,01-0,1 мкг/мл. Используемый в этих целях пул плазмы крови человека получают из крови здоровых доноров, собранной в покрытые EDTA шприцы. Клеточные компоненты удаляют путем центрифугирования, а верхнюю фазу в виде плазмы крови собирают и после этого объединяют. В качестве контроля неинкубированные конструкции на основе антитела разводят непосредственно перед анализом цитотоксичности в соответствующей среде, например, RPMI-1640. Стабильность в плазме крови рассчитывают как соотношение EC_{50} (после инкубации плазмы крови) и EC_{50} (контроль/без инкубации).

Также предпочтительно, чтобы преобразование мономеров в димеры конструкций на основе антител было низким. Степень преобразования можно определять в разных условиях и анализировать посредством высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. См. пример 8. Например, инкубацию мономерных изоформ конструкций на основе антител можно проводить в течение 7 дней при 37°C в буфере генерического состава и в концентрациях, составляющих, например, 100 мкг/мл или 250 мкг/мл, в инкубаторе с последующей высокоэффективной SEC для определения процентной доли исходной мономерной конструкции на основе антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию на основе антитела. В таких условиях предпочтительно, чтобы конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрировали процентное содержание димеров, которое составляет ≤8%, предпочтительно ≤6%, более предпочтительно ≤5%, более предпочтительно ≤4%, даже более предпочтительно ≤3%, даже более предпочтительно ≤2,5%, даже более предпочтительно ≤2%, даже более предпочтительно ≤1,5% и наиболее предпочтительно ≤1%, или ≤0,5%, или даже 0%.

Аналогично подразумевается, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрируют низкий уровень преобразования в димеры после некоторого количества циклов замораживания/оттаивания. Например, мономер конструкции на основе антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в буфере генерического состава препарата и подвергают трем циклам замораживания/оттаивания (замораживание при -80°C в течение 30 мин. с последующим оттаиванием в течение 30 мин. при комнатной температуре) с последующей высокоэффективной SEC для определения процентной доли исходно мономерной конструкции на основе антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию на основе антитела. Предполагается, что процентное содержание димеров конструкций на основе антител составляет ≤8%, предпочтительно ≤6%, более предпочтительно ≤5%, более предпочтительно ≤4%, даже более предпочтительно ≤3%, даже более предпочтительно ≤2,5%, даже более предпочтительно ≤2%, даже более предпочтительно ≤1,5% и наиболее предпочтительно ≤1%, или ≤0,5%, или даже ≤0%, например, после трех циклов замораживания/оттаивания.

Согласно одному варианту осуществления конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрируют хорошую термостабильность с температурой агрегации ≥45°C или ≥46°C, более предпочтительно ≥47°C или ≥48°C, даже более предпочтительно ≥49°C или ≥50°C и наиболее предпочтительно ≥51°C. Параметр термостабильности можно определить в контексте температуры агрегации антитела следующим образом: Раствор антитела в концентрации 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство для исследования по методу динамического рассеяния света (DLS). Образец нагревают от 40°C до 70°C при скорости нагревания 0,5°C/мин. с постоянным измерением определяемого радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление и агрегацию белка, используют для расчета температуры агрегации антитела. См. пример 9.

В альтернативном варианте температурные кривые плавления можно определить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для определения характеристических биофизических стабильностей белка конструкций антител. Эти эксперименты можно проводить с использованием устройства MicroCal LLC VP-DSC. Поглощение энергии образцом, содержащим конструкцию на основе антитела, регистрируют в диапазоне от 20°C до 90°C и сравнивают с образцом, содержащим только буфер для составления. Конструкции на основе антител доводили до конечной концентрации 250 мкг/мл, например, в подвижном буфере для SEC. Для получения соответствующей кривой плавления общую температуру образца пошагово повышают. Поглощение энергии образцом и стандартным буфером для составления регистрируют при каждом значении температуры. Разницу в поглощении энергии Cp (ккал/моль/°C) образцом за вычетом стандарта наносят на график как зависимость от соответствующей температуры. Температуру плавления определяют как температуру при первом максимуме поглощения энергии.

Предполагается также, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению характеризуются мутность, составляющей ≤ 0,2 или ≤ 0,15, предпочтительно ≤ 0,10 или ≤ 0,08, более предпочтительно ≤ 0,06 или ≤ 0,05 и наиболее предпочтительно ≤ 0,04 или ≤ 0,03. Мутность можно измерить по OD при 340 нм при концентрации конструкции на основе антитела 2,5 мг/мл и инкубации в течение 16 ч. при 5°C. См. пример 10.

Можно измерить изменения активности целевой конструкции на основе антитела x CD3 в зависимости от предварительной инкубации конструкции на клетках-мишенях в отсутствие T-клеток. Если конструкция на основе антитела интернализована, ожидается, что она подвергнется разрушению в лизосомах. Следовательно, ожидается, что эффективная концентрация со временем будет уменьшаться, и, таким образом, кажущаяся эффективность также должна снизиться. Эффект наблюдался в случае с некоторыми мишенями, для которых это явление является известным. Предполагается, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению не будут интернализованы или не будут подвергаться значительной интернализации клеткой-мишенью. Скорость интернализации можно оценить, например так, как это описано ниже: T-клетки подсчитывают и разбавляют до концентрации 1 x 10^5/мл в аналитической среде. Клетки-мишени, положительные в отношении мишени, подсчитывают и высевают, например, при 2500 клеток на лунку (cpw). Конструкцию на основе антитела серийно разводят 1:2, например при начальной концентрации 100 нМ. Конструкцию на основе антитела добавляют в планшеты для анализа культуры для обеспечения инкубации в течение 0 часов, 1 часа или 2 часов перед добавлением T-клеток. Затем T-клетки высевают при 25000 cpw (E:T=10:1), и смесь для анализа инкубируют в течение 48 часов при 37°C. Анализируют выживаемость клеток-мишеней, например, посредством системы Steady-Glo® (25 мкл/лунку). Предпочтительно скорость интернализации (например, измеренная в виде снижения цитотоксичности) составляет ≤ 20% после 2-часовой (предварительной) инкубации конструкции на основе антитела с клеткой-мишенью, более предпочтительно ≤

15%, даже более предпочтительно ≤ 10% и наиболее предпочтительно ≤ 5%.

Кроме того, для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предусмотрено, что выделенная или растворимая мишень существенно не ухудшает ее эффективность или биологическую активность. Это можно измерить, например, в анализе цитотоксичности, когда растворимую мишень добавляют в смесь для анализа в возрастающих концентрациях, например при 0 нМ – 0,3 нМ – 0,7 нМ – 1 нМ – 3 нМ – 7 нМ – 12 нМ. Типичное значение E:T составляет 10:1. Значение EC50 для исследуемой конструкции на основе антитела не должно значительно увеличиваться в присутствии растворимой мишени.

В дополнительном варианте осуществления конструкция на основе антитела согласно настоящему изобретению является стабильной при кислом показателе pH. Чем более толерантно функционирует конструкция на основе антитела при отличном от физиологического показателе pH, таком как pH 5,5 (pH, который требуется для проведения, например, катионообменной хроматографии) тем выше степень извлечения конструкции на основе антитела, элюированной из ионообменной колонки, относительно общего количества загруженного белка. Извлечение конструкции на основе антитела из ионообменной (например, катионообменной) колонки при показателе pH 5,5 составляет предпочтительно ≥ 30%, более предпочтительно ≥ 40%, более предпочтительно ≥ 50%, еще более предпочтительно ≥ 60%, еще более предпочтительно ≥ 70%, еще более предпочтительно ≥ 80% и наиболее предпочтительно ≥ 95%. Процентный показатель представляет собой площадь под кривой (= AUC) основного пика. См. пример 11.

Кроме того, предполагается, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению проявляют терапевтическую эффективность, которая проявляется в виде противоопухолевой активности или ингибирования роста опухоли. Это можно, например, оценить в исследовании, описанном в примерах 13 или 14. В одном варианте осуществления ингибирование роста опухоли конструкцией на основе антитела по настоящему изобретению T/C [%] составляет ≤ 70, ≤ 60, ≤ 50, ≤ 40, ≤ 30, ≤ 20, ≤ 10, ≤ 5, ≤ 4, ≤ 3 или ≤ 2. Также предполагается модификация или адаптация определенных параметров данных исследований (например, количество инъецируемых опухолевых клеток, участок инъекции, количество трансплантируемых Т-клеток человека, предназначенное для введения количество конструкций на основе антител и график введения) с получением при этом значимого и воспроизводимого результата.

В настоящем изобретении дополнительно представлены полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот представляют собой биополимеры, состоящие из нуклеотидов. Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или более нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепи. ДНК (такие как кДНК) и РНК (такие как мРНК) представляют собой примеры полинуклеотидов/молекул нуклеиновых кислот с определенной биологической функцией. Нуклеотиды представляют собой органические молекулы, служащие в качестве мономеров или субъединиц молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид по настоящему изобретению может быть двухцепочечной или одноцепочечной, линейной или кольцевой. Предполагается, что молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид содержится в векторе. Кроме того, предполагается, что такой вектор содержится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, способна к экспрессии конструкции на основе антитела. Для этого полинуклеотид или молекулу нуклеиновой кислоты функционально связывают с регуляторными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, посредством которого информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновых кислотах), транслируется в белок. Биологическая расшифровка в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определяемом мРНК, используя молекулы тРНК для переноса аминокислот и для считывания тринуклеотидов мРНК за раз. Код определяет, каким образом последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какая аминокислота будет добавляться следующей в ходе синтеза белка. За некоторыми исключениями тринуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты предопределяет одну аминокислоту. Поскольку подавляющее большинство генов кодируется абсолютно одинаковым кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом.

Вырожденность кодонов – это избыточность генетического кода, проявляющаяся в виде множественности комбинаций кодонов из трех пар оснований, которые определяют аминокислоту. Вырожденность существует ввиду того, что кодонов больше, чем кодируемых аминокислот. Кодоны, кодирующие одну аминокислоту, могут отличаться в любом из трех положений; однако чаще всего это различие находится во втором или третьем положении. Например, кодоны GAA и GAG определяют глутаминовую кислоту и проявляют избыточность; но ни один из них не определяет какую-либо другую аминокислоту и, следовательно, не демонстрирует двусмысленности. Генетические коды разных организмов могут проявлять тенденцию к смещению в сторону применения одного из нескольких кодонов, которые кодируют одну и ту же аминокислоту, по сравнению с другими, то есть будет обнаружена более высокая частота одного, чем ожидалось при случайном выборе. Например, лейцин определяется шестью различными кодонами, некоторые из которых используются редко. Для большинства организмов доступны таблицы использования кодонов с подробным описанием частот использования геномных кодонов. В рекомбинантных генных технологиях, как правило, используется преимущество этого эффекта за счет реализации методики, называемой оптимизацией кодонов, в которой эти кодоны используются для создания полинуклеотида, который предпочтительнее для соответствующей клетки-хозяина (например, клетки, полученные от человека и хомячка, клетка Escherichia coli или клетка Saccharomyces cerevisiae), например для увеличения экспрессии белка. Следовательно, предполагается, что полинуклеотиды/молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению оптимизированы по кодонам. Тем не менее, полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут быть сконструированы с применением любого кодона, который кодирует требуемую аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кодирующие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, находятся в форме одной отдельной молекулы или в форме двух или более отдельных молекул. Если конструкция на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела, то полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие такую конструкцию, скорее всего, также будут в форме одной отдельной молекулы. Однако также предполагается, что различные компоненты конструкции на основе антитела (такие как разные домены, например, домен, который связывается с CLDN18.2, домен, который связывается с CD3, и/или дополнительные домены, такие как константные домены антитела) расположены на отдельных полипептидных цепях, и в этом случае полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, скорее всего, находится в форме двух или более отдельных молекул.

То же самое применимо к вектору, содержащему полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Если конструкция на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела, один вектор может содержать полинуклеотид, который кодирует конструкцию на основе антитела в одном месте (как одна открытая рамка считывания, ORF). Один вектор может также содержать два или более полинуклеотида/молекул нуклеиновых кислот в разных местах (с отдельными ORF), каждый из которых кодирует другой компонент конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Предполагается, что вектор, содержащий полинуклеотида/молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, находится в форме одного отдельного вектора или двух или более отдельных векторов. В одном варианте осуществления и с целью экспрессии конструкции на основе антитела в клетке-хозяине клетка-хозяин по настоящему изобретению должна содержать полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию на основе антитела, или вектор, содержащий такой полинуклеотид/такую молекулу нуклеиновой кислоты в их полном объеме, что означает, что все компоненты конструкции на основе антитела независимо от того, закодированы ли они как одна отдельная молекула или в отдельных молекулах/местоположениях, будут подвергаться сборке после трансляции и вместе образовывать биологически активную конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению.

Также в настоящем изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, используемую в качестве носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку, обычно с целью репликации и/или экспрессии. Термин "вектор" охватывает без ограничения плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Некоторые векторы разработаны специально для клонирования (векторы клонирования), другие для экспрессии белков (векторы экспрессии). Так называемые векторы транскрипции в основном используются для амплификации их вставки. Манипуляции с ДНК обычно проводят в векторах на основе E. coli, которые содержат элементы, необходимые для их поддержания в E. coli. Однако векторы также могут иметь элементы, которые позволяют им сохраняться в другом организме, таком как клетки дрожжей, растений или млекопитающих, и эти векторы называются челночными векторами. Вставка вектора в целевую клетку или клетку-хозяина обычно называется трансформацией для бактериальных клеток и трансфекцией для эукариотических клеток, в то время как вставка вирусного вектора часто называется трансдукцией.

Обычно сконструированные векторы содержат точку начала репликации, сайт множественного клонирования и селективный маркер. Сам вектор, как правило, представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, содержащую вставку (трансген) и более крупную последовательность, которая служит в качестве "остова" вектора. Хотя генетический код определяет полипептидную последовательность для данной кодирующей области, другие геномные области могут влиять на то, когда и где продуцируются эти полипептиды. Таким образом, современные векторы могут включать дополнительные элементы помимо вставки из трансгена и скелета: промотор, генетический маркер, ген устойчивости к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессионными векторами (экспрессионными конструкциями), специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно содержат регуляторные последовательности.

Выражение "регуляторные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательность в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования, последовательности Козак и энхансеры.

Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она размещена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК, кодирующая предпоследовательность или лидерную последовательность для секреции, функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если он экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы содействовать трансляции. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные нуклеотидные последовательности являются смежными, а в случае лидерной последовательности для секреции являются смежными и находятся в фазе считывания. При этом энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляется путем лигирования в подходящих сайтах рестрикции. Если такие сайты не существуют, в соответствии с традиционной практикой используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры.

"Трансфекция" представляет собой способ преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторов) в клетки-мишени. Этот термин используется в основном для обозначения невирусных способов введения для эукариотических клеток. Трансдукция часто используется для описания вирус-опосредованного переноса молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных, как правило, включает открытие временных пор или "отверстий" в клеточной мембране, чтобы обеспечить поглощение материала. Трансфекцию можно проводить с использованием биологических частиц (например, вирусная трансфекция, также называемая вирусной трансдукцией), химических методов (например, с использованием фосфата кальция, липофекции, FuGENE, катионных полимеров, наночастиц) или физической обработки (как, например, посредством электропорации, микроинъекции, генной пушки, сжатия клеток, магнитофекции, гидростатического давления, импалефекции, обработки ультразвуком, оптической трансфекции, теплового шока).

Термин "трансформация" применяется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии, а также в эукариотические клетки, не относящиеся к клеткам животных, включая клетки растений. Следовательно, трансформация представляет собой генетическое изменение бактериальной или не относящиеся к клеткам животных эукариотической клетки в результате прямого поглощения через клеточную(-ые) мембрану(-ы) из окружающей среды и последующее включение экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновых кислот). Трансформацию можно осуществлять посредством искусственных средств. Для того, чтобы произошла трансформация, клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетенции, которое может наступать в виде ограниченного во времени ответа на определенные внешние условия, такие как голодание и плотность клеток, а также может быть искусственно индуцировано.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектором по настоящему изобретению.

Используемые в данном документе термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" предназначены для включения любой отдельной клетки или культуры клеток, которые могут быть или были реципиентом векторов, молекул экзогенной нуклеиновой кислоты и/или полинуклеотидов, кодирующих конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, и/или реципиентами самой конструкции на основе антитела. Введение соответствующего материала в клетку проводят путем трансформации, трансфекции и т. д. (см. выше). Также предполагается, что термин "клетка-хозяин" включает потомство или потенциальное потомство одной клетки. Поскольку в последующих поколениях могут иметь место определенные модификации вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации или вследствие влияния окружающей среды, такое потомство может в действительности быть не полностью идентичным (по морфологии или по комплекту геномной или общей ДНК) родительской клетке, но по-прежнему включаться в объем термина, используемого в данном документе. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки и также включают без ограничения бактерии (например, E. coli), клетки дрожжей, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мыши, крысы, макака или человека.

Помимо прокариот эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Saccharomyces cerevisiae или обыкновенные пекарские дрожжи – наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако широкодоступными и применимыми в данном документе являются многие другие роды, виды и штаммы, такие как Schizosaccharomyces pombe, хозяева из рода Kluyveromyces, такие как K. lactis, K. fragilis (ATCC 12424), K. bulgaricus (ATCC 16045), K. wickeramii (ATCC 24178), K. waltii (ATCC 56500), K. drosophilarum (ATCC 36906), K. thermotolerans и K. marxianus; Yarrowia (EP 402 226); Pichia pastoris (EP 183 070); Candida; Trichoderma reesia (EP 244 234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, такие как Schwanniomyces occidentalis; и мицелиальные грибы, такие как Neurospora, Penicillium, Tolypocladium, и хозяева из рода Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger.

Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии гликозилированной конструкции на основе антитела, происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было идентифицировано множество штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующие пермиссивные клетки-хозяева от таких насекомых-хозяев, как Spodoptera frugiperda (гусеница), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (плодовая мушка) и Bombyx mori. Общедоступными являются различные штаммы вирусов для трансфекции, например, вариант L-1 NPV Autographa californica и штамм Bm-5 NPV Bombyx mori, и такие вирусы можно применять в данном документе в качестве вируса согласно настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток Spodoptera frugiperda.

Культуры клеток растений из хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, арабидопсиса и табака также можно использовать в качестве хозяев. Клонирующие и экспрессионные векторы, применимые в получения белков в культуре клеток растений, известны специалистам в данной области техники. См., например, Hiatt et al., Nature (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) The Plant J 8: 745-750 и Fecker et al. (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.

Однако наибольший интерес представляли клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре клеток) стало рутинной процедурой. Примерами используемых линий клеток-хозяев от млекопитающих являются линия клеток почек обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (например, COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почек человека (например, 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al. , J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (например, BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (например, CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (например, TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (как, например, CV-1, ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (как, например, VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (как, например, HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (как, например, MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (как, например, BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (как, например, W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (как, например, Hep G2,1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (как, например, MMT 060562, ATCC CCL-51 1); клетки TRI (Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (например, Hep G2).

В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению представлен способ получения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, при этом указанный способ предусматривает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, и выделение полученной конструкции на основе антитела из культуры.

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток in vitro в подходящих условиях в культуральной среде. Клетки выращивают и поддерживают в среде для роста клеток при соответствующей температуре и газовой смеси. Условия культивирования широко варьируются для каждого типа клеток. Типичными условиями роста являются температура приблизительно 37°C, концентрация CO2 приблизительно 5% и влажность приблизительно 95%. Составы питательных сред могут отличаться, например, исходя из следующего: pH, концентрация источника углерода (например, глюкозы), природа и концентрация факторов роста, а также присутствие других питательных веществ (таких как аминокислоты или витамины). Факторы роста, используемые для дополнения сред, часто получают из сыворотки крови животных, такой как фетальная бычья сыворотка (FBS), фетальная телячья сыворотка (FCS), лошадиная сыворотка и свиная сыворотка. Клетки можно выращивать либо в суспензии, либо в виде адгезивных культур. Также существуют клеточные линии, которые были модифицированы для выживания в суспензионных культурах, с целью их выращивания до более высокой плотности, чем позволяют условия адгезии.

Термин "экспрессия" включает любую стадию, включенную в получение конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, в том числе без ограничения транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, фолдинг, посттрансляционную модификацию, нацеливание на конкретные субклеточные или внеклеточные местоположения и секрецию. Термин "извлечение" относится к ряду процессов, предназначенных для выделения конструкции на основе антитела из культуры клеток. Способ "извлечения" или "очистки" может обеспечить разделение белковых и небелковых частей культуры клеток и, в конечном итоге, разделение требуемой конструкции на основе антитела и всех других полипептидов и белков. На стадиях разделения обычно используются отличия в размере белков, физико-химических свойствах, аффинности связывания и биологической активности. Препаративная очистка направлена на получение относительно большого количества очищенных белков для последующего применения, в то время как аналитическая очистка дает относительно небольшое количество белка для различных исследовательских или аналитических целей.

При использовании рекомбинантных технологий конструкцию на основе антитела можно получать внутри клетки, в периплазматическом пространстве или она может секретироваться непосредственно в среду. Если конструкцию на основе антитела получают внутри клетки, то на первой стадии дебрис в форме частиц, представляющий собой либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, удаляют, например путем центрифугирования или ультрафильтрации. Конструкция на основе антитела по настоящему изобретению может, например, продуцироваться бактериями, например, E. coli. После экспрессии конструкцию выделяют из бактериальной клеточной массы в растворимой фракции, и ее можно очищать посредством, например, аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Конечная очистка может быть проведена аналогично способу очистки конструкции на основе антитела, экспрессируемой в клетках млекопитающих и секретируемой в среду. Carter et al. (Biotechnology (NY) 1992 Feb;10(2):163-7) описана процедура выделения антител, секретируемых в периплазматическое пространство E. coli.

Если антитело секретируется в среду, образцы надосадочной жидкости из таких систем экспрессии, как правило, вначале концентрируют с применением коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, блока для ультрафильтрации.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, полученную из клеток-хозяев, можно выделять или очищать, используя, например, хроматографию на гидроксилапатите, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию. Также доступны другие методики очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, смешанный режим ионного обмена, HIC, осаждение этанолом, эксклюзионная хроматография, обращенно-фазовая HPLC, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин-сефарозе, хроматография на анионной или катионообменной смоле (например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), иммуноаффинная (например с белком A/G/L) хроматография, хроматофокусирование, SDS-PAGE, ультрацентрифугирование и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от конструкции на основе антитела, подлежащую извлечению.

На любой из предыдущих стадий может быть добавлен ингибитор протеазы для ингибирования протеолиза, и могут быть добавлены антибиотики для предотвращения роста контаминантов.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция или состав, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или конструкцию на основе антитела, полученную согласно способу по настоящему изобретению.

Применяемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. В частности, предпочтительная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит одну или совокупность конструкций на основе антител по настоящему изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие составы из одного или нескольких (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адъювантов. Приемлемые составляющие компоненты композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В целом применяемое в данном документе выражение "фармацевтически приемлемый носитель" означает любые и все водные, и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, фосфатно-буферные солевые растворы (PBS), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих средств, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности с парентеральным введением. Применение таких сред и средств в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, а композиции, содержащие такие носители, можно составлять посредством хорошо известных стандартных способов.

В определенных вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению и дополнительно одно или несколько вспомогательных веществ, таких как описанные в данном разделе и в другом месте данного документа в иллюстративных целях. В настоящем изобретении могут применяться вспомогательные вещества для широкого спектра целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирование вязкости, и/или способы по настоящему изобретению, предназначенные для повышения эффективности и/или стабилизации таких составов, и способы, направленные против деградации и ухудшения качества, например, по причине стрессовых воздействий, возникающих в ходе изготовления, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него. Вспомогательные вещества, как правило, следует использовать в наиболее низких эффективных концентрациях.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для изменения, поддержания или сохранения определенных характеристик композиции, например, показателя pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции (см., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18" Edition, 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления могут включать без ограничения:

- аминокислоты
- антимикробные средства, такие как антибактериальные и противогрибковые средства;
- антиоксиданты;
- буферы, буферные системы и буферные средства, которые используются для поддержания композиции при физиологическом показателе pH или немного более низком pH, обычно в диапазоне pH от приблизительно 5 до приблизительно 8 или 9;
- неводные растворители, растительные масла и инъекционные органические сложные эфиры;
- водные носители, включая воду, спиртовые/водные носители, эмульсии или суспензии, включая солевые и забуференные среды;
- биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;
- объемообразующие средства;
- хелатирующие средства;
- изотонические средства и средства, замедляющие всасывание;
- комплексообразующие средства;
- наполнители;
- углеводороды;
- (низкомолекулярные) белки, полипептиды или белковые носители, предпочтительно человеческого происхождения;
- красители и вкусоароматические средства;
- серосодержащие восстановители;
- разбавители;
- эмульгаторы;

- гидрофильные полимеры;
- солеобразующие противоионы;
- консерванты;
- комплексы металлов;
- растворители и сорастворители;
- сахара и сахароспирты;
- суспендирующие средства;
- поверхностно-активные вещества или смачивающие средства;
- средства, повышающие стабильность;
- средства, повышающие тоничность;
- носители для парентерального введения;
- носители для внутривенного введения.

Общеизвестно, что разные составляющие компоненты фармацевтической композиции могут выполнять разную функцию, например, аминокислота может действовать в качестве буфера, стабилизатора и/или антиоксиданта; маннит может действовать в качестве объемообразующего средства и/или средства, повышающего тоничность; хлорид натрия может действовать в качестве среды для доставки и/или средства, повышающего тоничность.

В контексте настоящего изобретения фармацевтическая композиция может содержать:

(a) конструкцию на основе антитела, описанную в данном документе,

(b) по меньшей мере одно буферное средство,

(c) по меньшей мере один сахарид и

(d) по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество;

где показатель pH фармацевтической композиции находится в диапазоне от 3,5 до 6.

В композиции, описанной выше, первый домен предпочтительно характеризуется изоэлектрической точкой (pI) в диапазоне от 4 до 9,5; второй домен характеризуется показателем pI в диапазоне от 8 до 10, предпочтительно от 8,5 до 9,0; и конструкция на основе антитела необязательно содержит третий домен, содержащий два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3, где указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом посредством пептидного линкера.

Также предусмотрено, что в композиции, описанной выше, по меньшей мере одно буферное средство присутствует в диапазоне концентраций от 5 до 200 мМ, более предпочтительно в диапазоне концентраций от 10 до 50 мМ. Также предусмотрено, что по меньшей мере один сахарид выбран из группы, состоящей из моносахарида, дисахарида, циклического полисахарида, сахароспирта, линейного разветвленного декстрана или линейного неразветвленного декстрана. Также предусмотрено, что дисахарид выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы и маннита, сорбита и их комбинаций. Кроме того, предполагается, что сахароспирт представляет собой сорбит. Также предусмотрено, что по меньшей мере один сахарид присутствует при концентрации в диапазоне от 1 до 15% (вес/объем), предпочтительно при концентрации в диапазоне от 9 до 12% (вес/объем). Также дополнительно предусмотрено, что конструкция на основе антитела присутствует при концентрации в диапазоне 0,1-8 мг/мл, предпочтительно 0,2-2,5 мг/мл, более предпочтительно 0,25-1,0 мг/мл.

Согласно одному варианту осуществления композиции, описанной выше, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полоксамера 188, плюроника F68, Triton X-100, полиоксиэтилена, PEG 3350, PEG 4000 и их комбинаций. Также дополнительно предусмотрено, что по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество присутствует при концентрации в диапазоне от 0,004 до 0,5% (вес/объем), предпочтительно при концентрации в диапазоне от 0,001 до 0,01% (вес/объем). Предусмотрено, что показатель pH композиции находится в диапазоне от 4,0 до 5,0, предпочтительно составляет 4,2. Также предусмотрено, что фармацевтическая композиция характеризуется осмолярностью в диапазоне от 150 до 500 мОсм. Дополнительно предусмотрено, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит вспомогательное средство, выбранное из группы, состоящей из одного или нескольких полиолов и одной или нескольких аминокислот. В контексте настоящего изобретения предусмотрено, что указанное одно или несколько вспомогательных средств присутствуют при концентрации в диапазоне 0,1-15% (вес/объем).

В настоящем изобретение также представлена фармацевтическая композиция, содержащая следующее:

(a) конструкцию на основе антитела, описанную в данном документе, которая предпочтительно присутствует при концентрации в диапазоне 0,1-8 мг/мл, предпочтительно 0,2-2,5 мг/мл, более предпочтительно 0,25-1,0 мг/мл,

(b) 10 мМ глутамата или ацетата,

(c) 9% (вес/объем) сахарозы или 6% (вес/объем) сахарозы и 6% (вес/объем) гидроксипропил-β-циклодекстрина,

(d) 0,01% (вес/объем) полисорбата 80,

где показатель pH жидкой фармацевтической композиции составляет 4,2.

Подразумевается, что композиция по настоящему изобретению может содержать в дополнение к определенной в данном документе конструкции на основе антитела по настоящему изобретению дополнительные биологически активные средства в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такие средства могут представлять собой лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечный тракт, лекарственные средства, действующие в качестве цитостатиков, лекарственные средства, предупреждающие гиперурикемию, лекарственные средства, подавляющие иммунные реакции, лекарственные средства, модулирующие воспалительную реакцию, лекарственные средства, действующие на систему кровообращения, и/или средства, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также предусматривается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению применяется в качестве комбинированной терапии, т. Е. в комбинации с другим противораковым лекарственным препаратом.

В данном контексте предполагается, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению (которая содержит конструкцию на основе антитела, содержащую первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, как более подробно описано в данном документе выше), кроме того, содержит средство, предпочтительно антитело или конструкцию на основе антитела, которое связывается с белком пути иммунных контрольных точек (например, PD-1 или CTLA-4) или с костимуляторным рецептором иммунных контрольных точек (например, 4-1BB). Настоящее изобретение также относится к комбинации конструкции на основе антитела по настоящему изобретению (которая содержит конструкцию на основе антитела, содержащую первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, как более подробно описано в данном документе выше) и средства, предпочтительно антитела или конструкции на основе антитела, которые связываются с белком пути иммунных контрольных точек (например, PD-1 или CTLA-4) или с костимуляторным рецептором иммунных контрольных точек (например, 4-1BB) Ввиду природы по меньшей мере двух компонентов комбинации, а именно их фармацевтической активности, комбинацию также можно назвать терапевтической комбинацией. В некоторых вариантах осуществления комбинация может быть в форме фармацевтической композиции или набора. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция или комбинация содержит конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению и антитело или конструкцию на основе антитела, которые связываются с PD-1. Белки, связывающие PD-1, применимые для этой цели, например, подробно описаны в PCT/US2019/013205.

Следовательно, в дополнительном аспекте настоящее изобретение направлено на фармацевтическую композицию или комбинацию, содержащую:

- конструкцию на основе антитела, содержащую первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки, как более подробно описано в данном документе выше, и
- антитело или конструкцию на основе антитела, которая связывается с PD-1 и содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 292, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 293, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 294, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 295, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 296, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 297;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 302, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 303, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 304, и/или

VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 305, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 306, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 307;

c) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 312, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 313, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 314, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 315, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 316, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 317;

d) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 322, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 323, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 324, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 325, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 326, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 327;

e) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 332, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 333, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 334, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 335, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 336, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 337;

f) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 342, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 343, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 344, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 345, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 346, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 347;

g) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 352, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 353, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 354, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 355, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 356, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 357; или

h) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 362, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 363, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 364, и/или VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 365, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 366, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 367.

В одном варианте осуществления описанные выше антитело или конструкция на основе антитела, которые связываются с PD-1, содержат:

(a) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 298, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 299;

b) a VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 308, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 309;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 318, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 319;

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 328, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 329;

e) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 338, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 339;

f) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 348, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 349;

g) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 358, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 359; или

h) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 368, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 369.

В одном варианте осуществления описанные выше антитело или конструкция на основе антитела, которая связывается с PD-1, содержат:

a) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 300, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 301;

b) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 310, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 311;

c) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 320, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 321;

d) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 330, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 331;

e) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 340, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 341;

f) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 350, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 351;

g) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 360, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 361; или

h) тяжелую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 370, и легкую цепь, приведенную под SEQ ID NO: 371.

В некоторых вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция определена в зависимости, например, от планируемых способа введения, формата доставки и требуемой дозы. См., например, выше Remington's Pharmaceutical Sciences. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость in vivo высвобождения и скорость in vivo выведения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления основная среда-носитель или основной носитель в фармацевтической композиции могут являться либо водными, либо неводными по своей природе. Например, подходящей средой-носителем или подходящим носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор, возможно, дополненные другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут быть подготовлены для хранения посредством смешивания выбранной композиции, обладающей требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (Remington's Pharmaceutical Sciences выше) в виде лиофилизированной массы или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению можно составлять в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции, предназначенные для применения в настоящем изобретении, можно получать в виде апирогенного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего необходимую конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В частности, подходящей средой-носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению составляют в виде стерильного изотонического раствора, надлежащим образом стабилизированного. В некоторых вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы со средством, которое может обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством инъекции вещества замедленного всасывания, или который может поддерживать длительную продолжительность циркуляции в кровотоке. В определенных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть использованы для введения требуемой конструкции на основе антитела.

Дополнительные фармацевтические композиции вполне очевидны специалистам в данной области техники, в том числе составы, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в составах для замедленной или контролируемой доставки. Специалистам в данной области техники известны способы составления различных средств замедленной или контролируемой доставки. Конструкция на основе антитела также может быть заключена в микрокапсулы, полученные, например, посредством методик коацервации или межфазной полимеризации в коллоидных системах доставки лекарственных средств или в макроэмульсиях. Такие методики выше раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences.

Фармацевтические композиции, используемые для введения in vivo, как правило, представлены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть выполнена посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. Если композиция лиофилизирована, то стерилизация посредством данного способа может быть выполнена либо до лиофилизации и восстановления, либо после них. Композиции для парентерального введения могут храниться в лиофилизированной форме или в форме раствора. Как правило, парентеральные композиции помещают в контейнер со стерильным входным отверстием, например, в пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Другой аспект изобретения включает самобуферизующиеся составы, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, которые можно использовать как фармацевтические композиции, что описано в международный патентной заявке WO 2006/138181. Доступны различные публикации по материалам и способам для стабилизации белка и составов, применимым в этом отношении, такие как Arawaka T. et al., Pharm Res. 1991 Mar;8(3):285-91; Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" в: Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) и Randolph and Jones, Pharm Biotechnol. 2002;13:159-75, см., в частности, разделы, относящиеся к вспомогательным веществам и способам для самобуферизующихся белковых составов, особенно в отношении белковых фармацевтических продуктов и способов для вариантов применения в ветеринарии и/или медицине.

Соли могут быть использованы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению с целью, например, регулирования ионной силы и/или изотоничности композиции или состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности конструкции на основе антитела или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением. Ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и за счет этого предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка.

Ионные соединения существенно различаются по своему воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных рангов ионов и их влияний на белки, которые можно применять при составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Один пример представляет собой ряд Гофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для денатурации и/или для солюбилизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов по отношению к "всаливанию" и "высаливанию" определяет их положение в ряде Хофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах или композициях, содержащих конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению в качестве объемообразующих средство, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Некоторые аминокислоты можно использовать для стабилизации белков в составе, другие применимы в ходе лиофилизации для обеспечения правильной структуры лиофилизированной массы и свойств активного ингредиента. Некоторые аминокислоты могут быть применимы для ингибирования агрегации белков как в жидких, так и в лиофилизированных составах, а другие применимы в качестве антиоксидантов.

Полиолы являются космотропными, и они применимы к качестве стабилизирующих средств как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от физических и химических процессов деградации. Полиолы также являются применимыми для регулирования тоничности и для защиты от стрессовых воздействий, обусловленных замерзанием-оттаиванием, в ходе транспортировки или получения сыпучих материалов в процессе производства. Полиолы также могут служить криопротекторами в контексте настоящего изобретения.

Определенные варианты осуществления состава или композиции, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут содержать поверхностно-активные вещества. Белок может быть подвержен адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое вещество-жидкость и жидкость-жидкость. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим при транспортировке и манипуляции с продуктом. Поверхностно-активные вещества обычно применяются для предупреждения, минимизации или уменьшения поверхностной адсорбции. Поверхностно-активные вещества также обычно применяются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Определенные варианты осуществления состава или композиции, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут содержать один или несколько антиоксидантов. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и предупреждения воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предупреждения окислительной деградации белков. Предполагается, что антиоксиданты, предназначенные для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с настоящим изобретением, могут быть водорастворимыми и сохранять свою активность в течение всего срока хранения продукта (композиции, содержащей конструкцию на основе антитела). Антиоксиданты также могут повреждать белки и, следовательно, среди прочего, должны быть выбраны таким образом, чтобы исключить или в достаточной степени снизить возможность повреждения антиоксидантами конструкции на основе антитела или других белков в составе.

Определенные варианты осуществления состава или композиции, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, могут содержать один или несколько консервантов. Консерванты необходимы, например, при разработке многодозовых парентеральных составов, которые подразумевают более одного отбора из одного контейнера. Их основная функция заключается в подавлении роста микробов и обеспечении стерильности продукта в течение всего срока годности или срока использования лекарственного средства. Хотя консерванты имеют долгую историю применения с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, включающих консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты очень часто оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в многодозовых белковых составах. На сегодняшний день большинство белковых препаратов были составлены только для однократного применения. Однако в случае возможности получения многодозовых составов, они обладают дополнительным преимуществом, заключающимся в обеспечении удобства для пациентов и улучшении товарного качества. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с добавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многоразовых шприцев-ручек. При составлении и разработке стабилизированных лекарственных форм необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном средстве должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в лекарственной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка.

Как и предполагалось, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем лиофилизированных составов. Высушенные сублимацией продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать разбавителем, содержащим консервант, в момент применения. Это сокращает время контакта консерванта с конструкцией на основе антитела, значительно минимизируя связанные с этим риски для стабильности. При использовании жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта. Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные вещества. После того, как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла либо в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

Биологическую активность фармацевтической композиции, определенной в данном документе, можно определить, например, посредством анализов цитотоксичности, описанных в следующих примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). Термин "эффективность" или "in vivo эффективность", применяемый в данном документе, относится к ответу на терапию фармацевтической композицией состава по настоящему изобретению с применением, например, стандартизированных критериев ответа NCI. Успех или in vivo эффективность терапии с применением фармацевтической композиции по настоящему изобретению относится к эффективности композиции в отношении предполагаемой для нее задачи, т. е. способности композиции достигать требуемого эффекта, т. е. уничтожения патологических клеток, например, опухолевых клеток. In vivo эффективность можно контролировать посредством общепринятых стандартных способов для соответствующих нозологических форм, включая без ограничения определение количества лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, сортировку клеток с активированной флуоресценцией, аспирацию костного мозга. В дополнение можно использовать клинико-химические параметры, специфические для конкретного заболевания, а также другие общепринятые стандартные способы. Кроме того, можно использовать компьютерную томографию, рентгенограмму, ядерно-магнитно-резонансную томографию, позитронно-эмиссионная томографию, биопсию/гистологическое исследование лимфатических узлов и другие утвержденные стандартные способы.

Другой значительной проблемой в разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, является прогнозируемое модулирование фармакокинетических свойств. В связи с этим можно установить фармакокинетический профиль лекарственного средства-кандидата, т. е. профиль фармакокинетических параметров, влияющих на способность конкретного лекарственного средства к лечению указанного состояния. Фармакокинетические параметры лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства к лечению определенной нозологической формы, включают без ограничения: период полувыведения, объем распределения, метаболизм при первом прохождении через печень и степень связывания с белками сыворотки крови. На эффективность указанного лекарственного средства может влиять любой из показателей, упомянутых выше.

"Период полужизни" представляет собой время, необходимое для того, чтобы количество уменьшилось до половины от его исходного значения. В медицинских науках период полужизни относится к периоду полужизни веществ или лекарственных средств в организме человека. В медицинском контексте период полужизни может относиться ко времени, за которое вещество/лекарственное средство утрачивает половину своей активности, например фармакологической, физиологической или радиационной активности. Периодом полужизни также может описываться время, которое требуется для достижения половинной концентрации лекарственного средства или вещества (например, конструкции на основе антитела по настоящему изобретению) в плазме/сыворотке крови от его значения в равновесном состоянии ("период полужизни в сыворотке крови"). Обычно устранение или удаление введенного вещества/лекарственного средства относится к очистке организма посредством биологических процессов, таких как метаболизм, экскреция, а также с вовлечением функции почек и печени. "Метаболизм при первом прохождении" представляет собой явление метаболизма лекарственного средства, при котором концентрация лекарственного средства снижается до его поступления в кровоток. Это доля лекарственного средства, утрачиваемая в ходе процесса абсорбции. Соответственно, под "метаболизмом при первом прохождении через печень" подразумевается способность лекарственного средства к превращению в процессе метаболизма при первом контакте с печенью, т. е. во время его первого прохождения через печень. "Объем распределения" (V_D) означает степень, с которой лекарственное средство распределяется в тканях тела, а не в плазме крови, более высокое V_D указывает на большее количество распределения в тканях. Удержание лекарственного средства может происходить в различных частях тела, в таких как внутриклеточные и внеклеточные пространства, ткани и органы и т. д. "Степень связывания с сывороткой крови" означает способность лекарственного средства взаимодействовать с белками сыворотки крови и связываться с ними, например альбумином, что приводит к снижению или потере биологической активности лекарственного средства.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, лаг-период (Tlag), Tmax, скорости всасывания и/или Cmax для заданного количества вводимого лекарственного средства. "Биодоступность" относится к той части введенной дозы лекарственного средства/вещества, которая достигает системного кровотока (компартмента крови). Если лекарственный препарат вводят внутривенно, его биодоступность принимают равной 100%. Однако при введении лекарственного препарата посредством других путей (например, перорально) его биодоступность обычно снижается. "Лаг-период" означает задержку по времени между введением лекарственного средства и его выявлением и возможностью его выявления в крови или плазме крови. Cmax представляет собой максимальную концентрацию в плазме крови, которой лекарственное средство достигает после введения (и до введения второй дозы). Tmax представляет собой время достижения Cmax. На время, необходимое для достижения концентрации лекарственного средства в крови или ткани, которая требует его биологического действия, влияют все параметры. Фармакокинетические параметры конструкций на основе антител, проявляющих межвидовую специфичность, можно определить в доклиническом испытании на животных с участием приматов, отличных от шимпанзе, как указано выше и также изложено, например, в публикации Schlereth et al. (выше).

В одном варианте осуществления представлена конструкция на основе антитела по настоящему изобретению (или конструкция на основе антитела, полученная согласно способу по настоящему изобретению), предназначенная для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести заболевания, предпочтительно новообразования. В другом варианте осуществления представлено применение конструкции на основе антитела по настоящему изобретению (или конструкции на основе антитела, полученной согласно способу по настоящему изобретению), в производстве лекарственного препарата для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести заболевания, предпочтительно новообразования. Также представлен способ предупреждения, лечения или уменьшения тяжести заболевания, предпочтительно новообразования, предусматривающий стадию введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции на основе антитела по настоящему изобретению (или конструкции на основе антитела, полученной согласно способу по настоящему изобретению). Выражения "нуждающийся в лечении субъект", или "пациент", или "нуждающийся в лечении" включают тех, у кого уже имеется заболевание, а также тех, у которых должно быть предотвращено заболевание. Эти термины также включают людей и других субъектов-млекопитающих, получающих профилактическое лечение или терапевтическое лечение.

Конструкции на основе антитела по настоящему изобретению и описанные в данном документе составы/фармацевтические композиции применимы для лечения, уменьшения тяжести и/или предупреждения описанного в данном документе медицинского состояния у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение конструкций на основе антитела/фармацевтической композиции в организм, выделенную ткань или клетку пациента или нуждающемуся в этом пациенту, у которого имеется заболевание/нарушение, симптом такого заболевания/нарушения или предрасположенность к такому заболеванию/нарушению, с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения тяжести, улучшения или заболевания, симптома заболевания или предрасположенности к заболеванию или воздействия на них. Термин "уменьшение тяжести", применяемое в данном документе, относится к улучшению болезненного состояния пациента путем введения конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению такому пациенту или нуждающемуся в этом субъекту. Такое улучшение может рассматриваться как замедление или прекращение прогрессирования заболевания у пациента и/или как уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты или продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждение ухудшения состояния или потери трудоспособности, обусловленной заболеванием. Используемый в данном документе термин "предупреждение" означает предотвращение возникновения или повторного возникновения заболевания, указанного в данном документе, путем введения конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

Термин "заболевание" относится к любому состоянию, лечение которого будет возможно посредством конструкции на основе антитела или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. Данный термин включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые являются причиной предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому заболеванию. Заболевание предпочтительно представляет собой новообразование, рак или опухоль. Заболевание, новообразование, рак или опухоль предпочтительно являются CLDN18.2-положительными, то есть характеризуются экспрессией или сверхэкспрессией CLDN18.2.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост ткани, как правило, но не всегда, образующий опухолевую массу. При сопутствующем образовании массы, ее обычно называют "опухолью". В опухолях головного мозга неконтролируемое деление клеток означает, что масса новообразования увеличивается в размере и в ограниченном пространстве, таком как внутричерепная полость, это быстро становится проблематичным, поскольку масса вторгается в пространство мозга, оказывая на него давление, что приводит к сдавливанию ткани головного мозга, и повышению внутричерепного давления, и разрушению паренхимы головного мозга. Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными (раковыми). Злокачественные новообразования/опухоли обычно называют раком. Они обычно инвазируют и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т. е. они распространяются в другие части, ткани или органы тела. "Первичная опухоль" представляет собой опухоль, растущую в анатомическом участке, где началось прогрессирование опухоли и продолжилось с образованием раковой массы. Например, опухоль головного мозга возникает при образовании аномальных клеток в головном мозге. Большинство видов рака развиваются в первичном очаге, но затем продолжают метастазировать или распространяться в другие части (например, ткани и органы) тела. Эти дополнительные опухоли являются "вторичными опухолями". Большинство видов рака по-прежнему называются по их первичному месту возникновения, даже после того, как они распространились в другие части тела.

Лимфомы и лейкозы являются лимфоидными новообразованиями. Для целей настоящего изобретения они также охватываются терминами "опухоль" или "рак". Для целей настоящего изобретения термины "новообразование", "опухоль" и "рак" могут использоваться взаимозаменяемо, и они включают как первичные опухоли/виды рака, так и вторичные опухоли/виды рака (или "метастазы"), а также массообразующие новообразования (опухоли) и лимфоидные новообразования (например, лимфомы и лейкозы), а также MRD.

Термин "минимальное остаточное заболевание" (MRD) относится к доказательству присутствия небольшого количества остаточных раковых клеток, которые остаются у пациента после лечения рака, например, когда у пациента достигнута ремиссия (отсутствуют симптомы и признаки заболевания). Лишь небольшое количество оставшихся раковых клеток, как правило, невозможно обнаружить обычными методами, поскольку стандартные тесты, используемые для оценки или обнаружения рака, недостаточно чувствительны для обнаружения MRD. В настоящее время доступны высокочувствительные молекулярно-биологические тесты для выявления MRD, такие как проточная цитометрия, ПЦР и секвенирование нового поколения. Данные тесты могут обеспечивать измерение минимальных уровней раковых клеток в образцах тканей, иногда даже до одной раковой клетки на миллион нормальных клеток. В контексте настоящего изобретения предполагается, что термины "предупреждение", "лечение" или "уменьшение тяжести" рака также включают "предупреждение, лечение или уменьшение тяжести

MRD" независимо от того, было ли MRD обнаружено или нет.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения новообразование, рак или опухоль выбраны из группы, включающей без ограничения (или состоящей из) рак желудочно-кишечного тракта, рак яичника и рак легкого. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения рак желудочно-кишечного тракта выбран из группы, состоящей из гастрального рака или рака желудка, рака пищевода, желудочно-пищеводного рака, рака поджелудочной железы и рака прямой кишки. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения рак яичника представляет собой муцинозный рак яичника. Согласно дополнительному варианту осуществления настоящего изобретения рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, как правило, конструируют для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частоты введения, для конкретных вариантов лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме помимо прочего. Материалы для композиции предпочтительно составляют в концентрациях, которые являются приемлемыми для данного участка введения. Таким образом, составы и композиции могут быть получены в соответствии с настоящим изобретением для доставки любым подходящим путем введения. В контексте настоящего изобретения пути введения включают без ограничения местные пути, энтеральные пути и парентеральные пути.

Если фармацевтическая композиция была лиофилизирована, то лиофилизированный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лиофилизированный материал можно восстанавливать, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, фосфатно-буферном солевом растворе (PSB) или в том же составе, в котором белок находился перед лиофилизацией. Фармацевтические композиции и конструкция на основе антитела по настоящему изобретению в особенности применимы для парентерального введения, например, внутривенной доставки, например, посредством инъекции или инфузии. Фармацевтические композиции могут быть введены с использованием медицинского устройства. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США №№ 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4,941,880; 5,064,413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которая может быть определена, например, в исследованиях с эскалацией дозы. Как изложено выше, конструкция на основе антитела по настоящему изобретению, демонстрирующая межвидовую специфичность, что описано в данном документе, также может быть успешно использована в доклинических исследованиях на приматах, отличных от шимпанзе. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. В области медицины хорошо известно, что дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, в том числе от размеров тела, площади поверхности тела, возраста пациента, конкретного соединения, подлежащего введению, пола, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых совместно.

"Эффективная доза" представляет собой количество терапевтического средства, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения требуемого эффекта. "Терапевтически эффективная доза" представляет собой количество, достаточное для обеспечения лечения или по меньшей мере частичного купирования заболевания и его осложнений, признаков и симптомов у пациента, страдающего этим заболеванием. Количества или дозы, эффективные для этого применения, будут зависеть от заболевания, подлежащего лечению (показания), доставляемой конструкции на основе антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, анамнеза пациента и реакции на терапевтическое средство, пути введения, размера (веса тела, поверхности тела) и/или состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента и общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащая доза может быть скорректирована по решению лечащего врача для достижения оптимального терапевтического эффекта.

Терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или предотвращению нарушений или недееспособности вследствие заболевания. При лечении опухолей, экспрессирующих CLDN18.2, терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно ингибирует рост опухолевых клеток на по меньшей мере приблизительно 20%, на по меньшей мере приблизительно 40%, на по меньшей мере приблизительно 50%, на по меньшей мере приблизительно 60%, на по меньшей мере приблизительно 70%, на по меньшей мере приблизительно 80% или на по меньшей мере приблизительно 90% по сравнению с пациентами, не получавшими лечение. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно также оценить в модели на животных, прогностической в отношении эффективности против опухолей человека.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен набор, содержащий конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, конструкцию на основе антитела, полученную согласно способу по настоящему изобретению, полинуклеотид по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению и/или клетка-хозяин по настоящему изобретению. В контексте настоящего изобретения, термин "набор" означает два или более компонентов, один из которых соответствует конструкции на основе антитела, фармацевтической композиции, полинуклеотиду, вектору или клетке-хозяину по настоящему изобретению, упакованных вместе в контейнере, емкости или иным образом. Следовательно, набор может описан как набор продуктов и/или инструментов, достаточных для достижения определенной цели, которые могут продаваться как единое целое.

Предполагается, что дополнительный компонент набора по настоящему изобретению представляет собой средство, предпочтительно антитело или конструкцию на основе антитела, которые связываются с белком пути иммунных контрольных точек (таким как PD-1 или CTLA-4) или с костимулирующим рецептором пути иммунных контрольных точек (например, 4-1BB). Данные средства описаны более подробно в данном документе выше. Согласно одному варианту осуществления набор содержит конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению и антитело или конструкцию на основе антитела, которая связывается с PD-1. Белки, связывающие PD-1, применимые для этой цели, например, подробно описаны в PCT/US2019/013205. В определенном варианте осуществления набор обеспечивает одновременное и/или последовательное введение компонентов.

Набор может содержать одну или несколько емкостей (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, пакеты) любых подходящих формы, размера и материала (предпочтительно, например, из водонепроницаемого пластика или стекла), содержащих конструкцию на основе антитела или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в подходящей дозировке для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать инструкции по применению (например, в виде листовки или инструкции-брошюры), средства для введения конструкции на основе антитела или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, такие как шприц, насос, инфузионная помпа и им подобные, средства для восстановления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению и/или средство для разбавления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению.

В настоящему изобретении также представлены наборы с устройством для однодозового введения. Набор по настоящему изобретению также может содержать первую емкость, содержащую высушенную/лиофилизированную конструкцию на основе антитела или фармацевтическую композицию, и вторую емкость, содержащую водный состав. В определенных вариантах осуществления данного изобретения представлены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы.

Настоящее изобретение относится к следующим пунктам.

Пункт 1. Конструкция на основе антитела, содержащая первый домен, который связывается с CLDN18.2 (предпочтительно имеющим SEQ ID NO: 1) на поверхности клетки-мишени и второй домен, который связывается с CD3 на поверхности Т-клетки.

Пункт 2. Конструкция на основе антитела согласно пункту 1, где первый домен связывается с первой внеклеточной петлей (петлей 1) CLDN18.2, причем петля предпочтительно имеет SEQ ID NO: 2.

Пункт 3. Конструкция на основе антитела согласно п. 1 или п. 2, содержащая:

- первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и

• второй домен, который связывается с CD3 человека на поверхности T-клетки, где

первый домен связывается с тем же эпитопом CLDN18.2, что и антитело или конструкция на основе антитела, содержащие домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140.

Пункт 4. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где конструкция на основе антитела конкурирует за связывание с антителом или конструкцией на основе антитела, содержащими домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140.

Пункт 5. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен конструкции на основе антитела связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 22, и необязательно также связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 24, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 23.

Пункт 6. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен конструкции на основе антитела связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 14, и/или с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO 15, и необязательно также связывается с одним или несколькими мутантами CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 и 21, но не связывается с мутантом CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 18.

Пункт 7. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен конструкции на основе антитела связывается с CLDN18.2 человека на поверхности клетки-мишени, где Glu (E) в положении 56 CLDN18.2 человека является необходимым для связывание первого домена, а Ala (A) в положении 42 и/или Asn (N) в положении 45 CLDN18.2 человека не является/являются необходимыми для связывания первого домена; и/или

Пункт 8. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен конструкции на основе антитела связывается с эпитопом CLDN18.2, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 266, но не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 265, и необязательно также не содержащим аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 267.

Пункт 9. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где второй домен связывается с CD3-эпсилон человека и с CD3-эпсилон Callithrix jacchus или Saimiri sciureus.

Пункт 10. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где:

a) конструкция на основе антитела, первый домен и/или второй домен являются человеческими или гуманизированными,

b) конструкция на основе антитела представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела,

c) первый домен находится в формате scFv,

d) второй домен находится в формате scFv,

e) первый и второй домены связаны посредством линкера, предпочтительно пептидного линкера, более предпочтительно глицинового/серинового линкера, и/или

f) конструкция на основе антитела содержит домен, обеспечивающий увеличенный период полужизни в сыворотке крови, например Fc-домен.

Пункт 11. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен не связывается или не связывается в значительной степени с

CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и/или CLDN9.

Пункт 12. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где:

a) аффинность первого домена к CLDN18.2 (например, huCLDN18.2) составляет ≤100 нМ, ≤90 нМ, ≤80 нМ, ≤70 нМ, ≤60 нМ, ≤50 нМ, ≤40 нМ, ≤30 нМ или ≤20 нМ, предпочтительно как измерено в анализе на основе клеток, таком как анализ по Скэтчарду;

b) аффинность второго домена к CD3 (например, huCD3, например huCD3-эпсилон) составляет ≤100 нМ, ≤90 нМ, ≤80 нМ, ≤70 нМ, ≤60 нМ, ≤50 нМ, ≤40 нМ, ≤30 нМ ≤20 нМ или ≤10 нМ, предпочтительно как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса, например анализе Biacore; и/или

c) значение EC_{50} для конструкции на основе антитела составляет ≤500 пМ, ≤400 пМ, ≤300 пМ, ≤280 пМ, ≤260 пМ, ≤250 пМ, ≤240 пМ, ≤220 пМ, ≤200 пМ, ≤180 пМ, ≤160 пМ, ≤150 пМ, ≤140 пМ, ≤120 пМ, ≤100 пМ, ≤90 пМ, ≤80 пМ, ≤70 пМ, ≤60 пМ, ≤50 пМ, ≤40 пМ, ≤30 пМ, ≤20 пМ, ≤15 пМ, ≤10 пМ или ≤5 пМ, предпочтительно как измерено в анализе цитотоксичности с помощью CLDN18.2-положительных клеток-мишеней (например, клеток CHO, трансфицированных SNU-601, SNU-620 или CLDN18.2) и стимулированных обогащенных CD8-положительных Т-клеток (человека) или нестимулированных мононуклеарных клеток периферической крови (человека) в качестве эффекторных клеток.

Пункт 13. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

a) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 123, CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 126; и

b) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 135, и CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 138.

Пункт 14. Конструкция на основе антитела согласно любому из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139.

Пункт 15. Конструкция на основе антитела согласно одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VL-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140.

Пункт 16. Конструкция на основе антитела согласно одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область и VL-область, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 127+128 или SEQ ID NO: 139+140.

Пункт 17. Конструкция на основе антитела согласно одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 141.

Пункт 18. Конструкция на основе антитела согласно одному из предыдущих пунктов, содержащая или состоящая из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 143 и SEQ ID NO: 144.

Пункт 19. Полинуклеотид, кодирующий конструкцию на основе антитела по любому из предыдущих пунктов.

Пункт 20. Вектор, содержащий полинуклеотид по пункту 19.

Пункт 21. Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом по пункту 19 или вектором по пункту 20.

Пункт 22. Способ получения конструкции на основе антитела по любому из пунктов 1-18, при этом указанный способ предусматривает культивирование клетки-хозяина по пункту 21 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанной конструкции на основе антитела, и извлечение полученной конструкции на основе антитела из культуры.

Пункт 23. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию на основе антитела по любому из пунктов 1-18 или полученную согласно способу по пункту 22.

Пункт 24. Конструкция на основе антитела по любому из пунктов 1-18 или полученная согласно способу по пункту 22 для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести заболевания, предпочтительно новообразования, более предпочтительно CLDN18.2-положительного новообразования.

Пункт 25. Конструкция на основе антитела по пункту 24, где заболевание или новообразование выбрано из группы, состоящей из рака желудочно-кишечного тракта, рака яичника и рака легкого.

Пункт 26. Конструкция на основе антитела по пункту 25, где рак желудочно-кишечного тракта выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, гастроэзофагеального рака, рака поджелудочной железы и колоректального рака.

Пункт 27. Набор, содержащий конструкцию на основе антитела по любому из пунктов 1-18, конструкцию на основе антитела, полученную согласно способу по пункту 22, полинуклеотид по пункту 19, вектор по пункту 20 и/или клетку-хозяина по пункту 21.

Пункт 28. Фармацевтическая композиция по пункту 23 или набор по пункту 27, дополнительно содержащие средство, предпочтительно антитело или конструкцию на основе антитела, которое связывается с белком пути иммунных контрольных точек (таким как PD-1 или CTLA-4) или с костимулирующим рецептором в пути иммунных контрольных точек (например, 4-1BB).

Пункт 29. Фармацевтическая композиция по пункту 23 или 28 или набор по пункту 27 или 28 для терапевтического применения, предпочтительно для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести заболевания, предпочтительно новообразования, более предпочтительно CLDN18.2-положительного новообразования.

На фигурах показано следующее.

Фигура 1

Выравнивание аминокислотных последовательностей CLDN18.1 и CLDN18.2 человека. Выделены первый и второй внеклеточные домены (= внеклеточные петли), а также аминокислотные положения, различающиеся между CLDN18.1 и CLDN18.2. В пределах внеклеточной петли 1 CLDN18.2 и CLDN18.1 различаются по восьми положениям. См. также пример 1.

Фигура 2

На фигуре изображены конструкции на основе CLDN18.2 (химеры/точечные мутации), которые получали для анализа картирования эпитопа в примере 2. На ней также показано выравнивание последовательностей между петлей 1 CLDN18.1 человека и петлей 1 CLDN18.2 человека и выделено восемь положений P1-P8, по которым эти две молекулы различаются. См. также пример 1.

Фигура 3

Результаты анализа картирования эпитопов, см. пример 2. На фигуре показаны результаты анализов FACS для нетрансфицированных клеток CHO, а также для клеток CHO, трансфицированных CLDN18.1 человека, CLDN18.2 человека, CLDN6 человека и CLDN9 человека (левая сторона). С правой стороны на фигуре показаны результаты анализов FACS для клеток CHO, трансфицированных тремя различными химерными конструкциями на основе CLDN18.2 человека. Аминокислотная последовательность всей петли 2 (ECL2, E2) была заменена последовательность., происходящей из CLDN9 человека, а области E2A и E2B были заменены аналогичной последовательностью из CLDN6 человека. Все антитела/конструкции на основе антител тестировали при концентрации 5 мкг/мл.

Фигура 4

Результаты анализа картирования эпитопов, см. пример 2. На фигуре показаны результаты анализов FACS для нетрансфицированных клеток CHO, а также для клеток CHO, трансфицированных CLDN18.1 человека, CLDN18.2 человека, CLDN6 человека и CLDN9 человека. Кроме того, на фигуре показаны результаты анализов FACS для клеток CHO, трансфицированных одиннадцатью различными конструкциями на основе CLDN18.2 человека, характеризующимися наличием одной, двух или трех точковых мутаций в указанных положениях P1-P8 (более подробные сведения см. также в примере 1), а также для клеток CHO, трансфицированных четырьмя различными конструкциями на основе химерного CLDN18.2 человека. Аминокислотная последовательность всей петли 2 (ECL2, E2) была заменена последовательностью, происходящей из CLDN9 человека, а области E1B, E1D и E1C были заменены аналогичной последовательностью из CLDN6 человека (более подробные сведения см. также в примере 1). Все моноспецифические антитела тестировали при концентрации 5 мкг/мл, тогда как конструкции на основе биспецифических антител к CD3xCLDN18.2 тестировали при концентрации 20 мкг/мл.

Строка 1: антитело собственной разработки к CLDN-18.1 человека.

Строка 2: антитело собственной разработки к CLDN-18.2 человека.

Строка 3: антитело к CLDN-6 человека (R&D; MAB3656).

Строка 4: антитело к CLDN-9 человека(ABIN1720917).

Строка 5: CL-1xI2C-scFc.

Строка 6: CL-2xI2C-scFc.

Строка 7: CL-4xI2C-scFc.

Строка 8: CL-3xI2C-scFc.

Фигура 5

Результаты анализа FACS, описанного в примере 5.

Фигура 6

Результаты анализа FACS, описанного в примере 6.

Фигура 7

Результаты анализов цитотоксичности на основе FACS, описанных в примере 7.4. Во всех шести протестированных клеточных линиях (пять линий клеток с естественной экспрессией и клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека) конструкции на основе антител по настоящему изобретению (CL-1 и CL-2) продемонстрировали значительно более высокие значения EC50 по сравнению с контрольными конструкциями, связывающимися с другим эпитопом CLDN18.2 (CL-3 и CL-4).

Фигура 8

Противоопухолевая активность конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 (средний объем опухоли со стандартной ошибкой среднего (SEM)). См. пример 13.

Фигура 9

Направленная против опухолеобразования активность конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 (средний объем опухоли со стандартной ошибкой среднего (SEM)). См. пример 14.

*****

Используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалисту в данной области техники, которые можно модифицировать или использовать вместо способов, описанных в данном документе.

Если не указано иное, то термин "по меньшей мере", предшествующий последовательности элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалистам в данной области техники будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

Термин "и/или", применяемый в любой части в данном документе, включает значения "и", "или" и "все элементы или любую другую их комбинацию, объединенные указанным термином".

Термин "приблизительно" или "примерно", применяемый в данном документе, означает в пределах ±20%, предпочтительно в пределах ±15%, более предпочтительно в пределах ±10% и наиболее предпочтительно в пределах ±5% от указанного значения или диапазона. Он также включает конкретное значение, например "приблизительно 50" включает значение "50".

Во всем данном описании и формуле изобретения, если по контексту не требуется иное, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. Термин "предусматривающий", при использовании в данном документе, можно заменить терминами "содержащий" или "включающий в себя", или иногда при использовании в данном документе термином "имеющий".

Применяемый в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не определенный в элементе пункта формулы изобретения. В контексте данного документа выражение "состоящий практически полностью из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают материального влияния на основные и новые характеристики заявляемого предмета.

В каждом случае любой из терминов "содержащий", "состоящий практически полностью из" и "состоящий из" можно заменить любым из оставшихся двух терминов.

Следует понимать, что приведенное выше описание и нижеприведенные примеры предоставляют иллюстративные варианты реализации, но настоящее изобретение не ограничивается конкретными методологиями, технологиями, протоколами, материалами, реагентами, веществами и т. д., описанными в данном документе, ввиду чего таковые могут варьироваться. Употребляемая в данном документе терминология используется только в целях описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевает ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения. Аспекты настоящего изобретения представлены в независимых пунктах формулы изобретения. Некоторые необязательные характеристики настоящего изобретения представлены в зависимых пунктах формулы изобретения.

Все публикации и патенты, упоминаемые по всему тексту настоящего описания (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, технические характеристики и инструкции от производителя и т. п.) выше или ниже, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Все изложенное в данном документе не следует воспринимать как признание того, что данное изобретение не имеет права противопоставлять такое описание на основании более раннего изобретения. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с данным описанием, это описание имеет приоритет относительно любого такого материала.

Лучшее понимание данного изобретения и его преимуществ обеспечат следующие примеры, приведенные исключительно в иллюстративных целях. Примеры не предназначены и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Пример 1

Получение клеток CHO, экспрессирующих мутации CLDN18.2

Для целей картирования эпитопа E1 (внеклеточная петля 1; ECL1, SEQ ID NO: 2) CLDN18.2 разделяли на четыре субдомена (E1A, E1B, E1C и E1D), а E2 (внеклеточная петля 2; ECL2. , SEQ ID NO: 3) разделяли на два субдомена (E2A и E2B). Аминокислотную последовательность соответствующей области эпитопа (петля/домен или субдомен) CLDN18.2 человека (E1, E1A, E1B, E1C, E1D, E2, E2A и E2B) заменяли аналогичной последовательностью из CLDN6 человека, за двумя исключениями (см. фигуры 1 и 2): E2 заменяли последовательностью, происходящей из CLDN9 человека; и в конструкции, имеющей мутированный E1C (замена CLDN18.2 E1C на аналогичную область CLDN6), E2 из CLDN18.2 также заменяли последовательностью, происходящей из CLDN9 человека. Последние служили средством обнаружения экспрессии химеры CLDN18.2/CLDN6. Экспрессию всех химерных конструкций в клетках CHO подтверждали с помощью анализа FACS (см. ниже). Поскольку не имелось доказательств экспрессии химерных конструкций E1 и E1A, эти конструкции не использовали для анализа картирования эпитопа. Таким образом, для картирования эпитопа получали и использовали следующие конструкции:

CLDN18.2-E1B (CLDN6) → SEQ ID NO: 22;

CLDN18.2-E1C (CLDN6)-E2 (CLDN9) → SEQ ID NO: 23;

CLDN18.2-E1D (CLDN6) → SEQ ID NO: 24;

CLDN18.2-E2 (CLDN9) → SEQ ID NO: 25;

CLDN18.2-E2A (CLDN6) → SEQ ID NO: 26;

CLDN18.2-E2B (CLDN6) → SEQ ID NO: 27.

Аминокислотные последовательности CLDN18.2-ECL2 человека и CLDN18.1-ECL2 человека являются идентичными, однако в пределах внеклеточной петли 1 CLDN18.2 и CLDN18.1 различаются по восьми положениям (29, 37, 42, 45, 47, 56, 65 и 69). Таким образом, получали и экспрессировали в клетках CHO дополнительные мутанты CLDN18.2, в которых эти восемь положений CLDN18.2 от "P1" до "P8" заменяли на их соответствующие аналоги CLDN18.1 либо по отдельности, либо в группе из двух или трех положений. Таким образом, получали следующие конструкции:

CLDN18.2-P1-CLDN18.1 (мутация Q29M) → SEQ ID NO: 11;

CLDN18.2-P2-CLDN18.1 (мутация N37D) → SEQ ID NO: 12;

CLDN18.2-P1/P2-CLDN18.1 (мутация Q29M/N37D) → SEQ ID NO: 13;

CLDN18.2-P3-CLDN18.1 (мутация A42S) → SEQ ID NO: 14;

CLDN18.2-<u>P4</u>-CLDN18.1 (мутация N45Q) → SEQ ID NO: 15;

CLDN18.2-<u>P5</u>-CLDN18.1 (мутация Q47E) → SEQ ID NO: 16;

CLDN18.2-<u>P3/P4/P5</u>-CLDN18.1 (мутация A42S/N45Q/Q47E) → SEQ ID NO: 17;

CLDN18.2-<u>P6</u>-CLDN18.1 (мутация E56Q) → SEQ ID NO: 18;

CLDN18.2-<u>P7</u>-CLDN18.1 (мутация G65P) → SEQ ID NO: 19;

CLDN18.2-<u>P8</u>-CLDN18.1 (мутация L69I) → SEQ ID NO: 20;

CLDN18.2-<u>P7/P8</u>-CLDN18.1 (мутация G65P/L69I) → SEQ ID NO: 21.

Для получения клеток CHO, экспрессирующих вышеуказанные конструкции, а также клеток CHO, экспрессирующих hu-CLDN18.2, hu-CLDN18.1, hu-CLDN6 и hu-CLDN9 (SEQ ID NO: 1, 4, 9 и 10) в качестве контролей, соответствующие кодирующие последовательности встраивали в плазмиду, обозначаемую как pEF-DHFR (pEF-DHFR описана в Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Все процедуры встраивания проводили согласно стандартным протоколам (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Для каждой конструкции соответствующей плазмидой трансфицировали DHFR-дефицитные клетки CHO для обеспечения эукариотической экспрессии, как описано в Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

Экспрессию вышеуказанных конструкций в клетках CHO подтверждали в ходе анализа FACS с использованием антител к CLDN18.2 (моноклональное антитело собственной разработки к CLDN18.2 человека), CLDN18.1 (моноклональное антитело собственной разработки к CLDN18.1 человека), CLDN6 (мышиное моноклональное антитело к CLDN6 человека, MAB3656 от R&D) и CLDN9 (крысиное моноклональное антитело к CLDN9 человека, ABIN1720917) соответственно в концентрации 5 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля клетки инкубировали с антителом изотипического контроля (BD 553454/R&D MAB0041/R&D MAB0061) вместо первого антитела. Связанное моноклональное антитело выявляли с помощью вторичных Fc-гамма-специфичных конъюгированных с PE антител к IgG мыши/крысы/человека (Jackson ImmunoResearch 115-116-071/112-116-071/109-116-098). Образцы подвергали измерению посредством проточной цитометрии.

<u>Пример 2</u>

Картирование эпитопов конструкций на основе антител к CLDN18.2

Клетки CHO, трансфицированные конструкциями, описанными в примере 1, окрашивали очищенными конструкциями на основе антител к CLDN18.2xCD3 в концентрации 20 мкг/мл. Связанные конструкции на основе антител выявляли с помощью Fc-гамма-специфичного конъюгированного с PE антитела к IgG человека (Jackson ImmunoResearch; 1:100). Все антитела разбавляли в PBS/2% FCS. В качестве отрицательного контроля клетки инкубировали с PBS/2% FCS, а затем с Fc-гамма-специфичным конъюгированным с PE антителом к IgG человека. Образцы подвергали измерению посредством проточной цитометрии.

Результаты анализа картирования эпитопа показаны на фигурах 3 и 4. Когда наблюдали потерю сигнала FACS для клеток, экспрессирующих определенную химеру или мутацию CLDN18.2, предполагали, что соответствующая конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3 связывается с эпитопом (петля/домен/субдомен) или с конкретной аминокислотой, которая была подвергнута замене в этой химерной или мутантной молекуле CLDN18.2. Другими словами, эта область эпитопа или аминокислота является необходимой для связывания конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3, которая была проанализирована. В дополнение к контрольным антителам, которые использовали для демонстрации надлежащей экспрессии соответствующей мишени, следующие конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 специально исследовали в анализе картирования эпитопа:

CL-1 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 132);

CL-2 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 144);

CL-3 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 149);

CL-4 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 154).

В то время как CL-1 x I2C-scFc и CL-2 x I2C-scFc представляют собой конструкции на основе антител согласно настоящему изобретению, CL-3 x I2C-scFc и CL-4 x I2C-scFc имеют связывающие CLDN18.2 области VH и VL, которые раскрыты под SEQ ID NO: 8+15 и SEQ ID NO: 6+11 соответственно в WO 2014/075788.

Как показано на фиг. 4, конструкция на основе антитела CL-3 x I2C-scFc явно требует наличия положений P3 (A42), P4 (N45) и P6 (E56) для осуществления своего специфического связывания с CLDN18.2. Положение P4 располагается в пределах субдомена, обозначенного как E1B, а положение P6 располагается в пределах субдомена, обозначенного как E1C. Следовательно и аналогично, замена этих субдоменов последовательностью их аналогов из CLDN6 приводит к потере сигнала FACS. Наблюдение касательно того, что эти три положения являются значимыми для связывания CL-3 x I2C-scFc с CLDN18.2, подтверждает ранее опубликованные результаты. Конструкция на основе антитела, обозначаемая как CL-4 x I2C-scFc, характеризуется очень похожим паттерном связывания (см. фиг. 4).

Напротив, обе конструкции на основе антитела CL-1 x I2C-scFc и CL-2 x I2C-scFc явно требуют наличия положения P6 (E56) для обеспечения их специфического связывания с CLDN18.2. Однако замена других положений, в частности P3 и P4, по-видимому, не влияет на связывание CL-1 x I2C-scFc или CL-2 x I2C-scFc с CLDN18.2. В соответствии с этим наблюдением, замена субдомена E1C (в пределах которого находится положение P6) последовательностью его аналога из CLDN6, а не замена E1B или E1D приводит к потере сигнала FACS. Результат картирования эпитопа, показанный на фигуре 4, таким образом, демонстрирует, что CL-1 x I2C-scFc и CL-2 x I2C-scFc связываются с одним и тем же эпитопом в пределах ECL1 CLDN18.2, и этот эпитоп отличается от эпитопа, распознаваемого CL-3 x I2C-scFc и CL-4 x I2C-scFc.

Пример 3

Основанное на системе Biacore определение аффинности к CD3 и FcRn

человека и яванского макака

Эксперименты на основе системы анализа Biacore проводили с использованием рекомбинантных белков CD3-ECD (ECD=внеклеточный домен) человека/макака, слитых с куриным альбумином, для определения связывания мишени конструкциями на основе антител по настоящему изобретению.

Подробнее, на сенсорных чипах CM5 (GE Healthcare) иммобилизировали приблизительно 600-800 RU соответствующего рекомбинантного антигена с использованием ацетатного буфера с pH 4,5 согласно руководству от производителя. Конструкцию на основе антитела к CLDN18.2xCD3 загружали в серии разведений, предусматривающей следующие концентрации: 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,13 нМ при разбавлении в подвижном буфере HBS-EP (GE Healthcare). Скорость потока составляла 30 мкл в течение 3 мин, затем подвижный буфер HBS-EP применяли в течение периода от 8 мин до 20 мин снова при скорости потока 30 мкл/мин. Восстановление чипа осуществляли с помощью раствора, предусматривающего 10 мМ глицина, 10 М NaCl при pH 1,5. Наборы данных анализировали с помощью программного обеспечения BiaEval. Обычно проводили два независимых эксперимента.

Конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению продемонстрировали высокие значения аффинности к CD3 человека в наномолярном диапазоне. Связывание с CD3 макака было соразмерным, и для него также демонстрировались значения аффинности в аналогичных диапазонах. Значения аффинности, а также вычисленное расхождение в аффинности показано в таблице 2.

Таблица 2. Значения аффинности конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 в отношении CD3 человека и макака, как определено посредством системы анализа Biacore, а также рассчитанные значения межвидовых расхождений в аффинности. Конструкции в строках 3-5 измеряли посредством другого (отдельного) анализа, чем для конструкций в строках 1 и 2

	Конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3	**KD для CD3 человека [нМ]**	**KD для CD3 макака [нМ]**	**Расхождение в аффинности: KD для макака/KD для человека**
1	CL-1 x I2C-scFc	23,5 ± 1,0	19,7 ± 1,1	0,84
2	CL-1 x I2C-6His	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	0,85
3	CL-2 x I2C-scFc	8,32 ± 0,64	4,67 ± 0,18	0,56
4	CL-3 x I2C-scFc	14,50 ± 0,07	7,91 ± 0,37	0,55
5	CL-4 x I2C-scFc	15,30 ± 2,55	9,19 ± 0,16	0,60

Аналогичным образом, соразмерное связывание с FcRn человека и макака подтверждали с помощью анализов Biacore для конструкций, обозначаемых как CL-1 x

I2C-scFc, CL-2 x I2C-scFc, CL-3 x I2C-scFc и CL-4 x I2C- scFc.

Пример 4

Анализ по Скэтчарду для определения аффинности к CLDN18.2 человека и макака на антиген-положительных клетках-мишенях

Значения аффинности конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 к клеткам CHO, трансфицированным CLDN18.2 человека или макака, определяли посредством анализа по Скэтчарду. Для этого анализа проводили эксперименты по насыщающему связыванию с применением моновалентной системы обнаружения для точного определения моновалентного связывания конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 с соответствующей линией клеток.

2x1042 x 10^4 клеток линии клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный CLDN18.2 человека, инкубировали с 50 мкл каждой из серии разведений (двенадцать разведений в соотношении 1:2) соответствующей конструкции на основе антитела (до достижения насыщения), начиная с 100-200 нМ, с последующей инкубацией в течение 16 ч при 4°C при перемешивании и одной стадией промывания остатка. Затем клетки инкубировали в течение еще одного часа с 30 мкл раствора Alexa Fluor™ 488-конъюгированного Fab-фрагмента антитела козы к IgG человека (H+L) AffiniPure™. После одной стадии промывания клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера для FACS, содержащего 3,5% формальдегид, инкубировали в течение дополнительных 15 мин, центрифугировали, ресуспендировали в буфере для FACS и анализировали с помощью программного обеспечения для FACS. Данные получали из двух независимых серий экспериментов, предусматривающих использование трех повторностей для каждой. Для экстраполяции максимального связывания (Bmax) проводили оценку с расчетом специфического связывания по соответствующему одному сайту. Определяемые концентрации конструкций на основе антител при полумаксимальном связывании отражали соответствующие KD. Значения измерений в трех повторностях наносили на график в виде гиперболических кривых и в виде S-образных кривых, демонстрирующих надлежащие диапазоны концентраций от минимального до оптимального связывания.

Значения, показанные в таблице 3, получали из двух независимых экспериментов для каждой конструкции на основе антитела. Клеточный анализ по Скэтчарду подтвердил, что конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению обладают наномолярной аффинностью по отношению к CLDN18.2 человека и ввиду идентичности последовательностей внеклеточных доменов человека и макака характеризуются межвидовым расхождением в аффинности для макака/человека, составляющим 1.

Таблица 3. Значения аффинности (KD) конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 к CLDN18.2, как определено в клеточном анализе по Скэтчарду. Конструкции на основе антител измеряли в двух независимых экспериментах, в каждом из которых использовали серию разведений. *CLDN18.2 человека и яванского макака характеризуются идентичной аминокислотной последовательностью во внеклеточных доменах. Следовательно, расхождение в аффинности составляет „1" по определению

Конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3	**Установленная в ходе клеточного анализа аффинность к CLDN18.2 человека [нМ]**	**Расхождение в аффинности: KD для макака/KD для человека ***
CL-1 x I2C-scFc	56,8 ± 10,7	1
CL-1 x I2C-6His	13,9 ± 1,8	1

В отдельном анализе по Скэтчарду, проводимом в тех же условиях, определяемую согласно клеточному анализу аффинность к CLDN18.2 человека, составляющую 11,13 ± 2,72, измеряли для CL-2 x I2C-scFc в тех же условиях.

<u>Пример 5</u>

Подтверждение связывания с CLDN18.2 и клетками, экспрессирующими CD3 человека/макака

Для подтверждения связывания с CLDN18.2 и CD3 человека и с CD3 макака конструкции на основе антител по настоящему изобретению тестировали при помощи проточной цитометрии с использованием:

- клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2 человека,
- линии CD3-экспрессирующих клеток Т-клеточного лейкоза человека HPB-all (DSMZ, Брауншвейг, ACC483) и
- линии CD3-экспрессирующих Т-клеток яванского макака LnPx 4119.

Для проточной цитометрии 200000 клеток соответствующих клеточных линий инкубировали в течение 60 мин при 4°C с очищенной конструкцией на основе антитела в концентрации 5 мкг/мл. После промывки связанные конструкции на основе антител, содержащие Fc-домен, выявляли с помощью Fc-гамма-специфичного конъюгированного с PE антитела козы к IgG человека (1:100) в течение 30 минут при 4°C. Конструкцию на основе антител, содержащую his-метку, выявляли с помощью мышиного антитела собственной разработки, специфичного в отношении связывающей части CD3, а затем Fc-гамма-специфичного конъюгированного с PE антитела козы к IgG мыши (1:100) в течение 30 минут при 4°C. Образцы измеряли посредством проточной цитометрии. Нетрансфицированные клетки CHO применяли в качестве отрицательного контроля.

Результаты показаны на фигуре 5. Конструкциями на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению окрашивали клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека. Линии экспрессирующих CD3 Т-клеток человека и макака также распознавались конструкциями на основе антител. Окрашивания нетрансфицированных клеток CHO не наблюдали, также как не наблюдали окрашивания трансфицированных CLDN18.2 клеток CHO, проводимого посредством конструкции на основе антител к EGFRvIIIxI2C-scFc в качестве отрицательного контроля.

<u>Пример 6</u>

Подтверждение отсутствия связывания с паралогами CLDN18.2 человека

Клетки CHO стабильно трансфицировали паралогами CLDN18.2 человека, представляющими собой CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и CLDN9. Последовательности паралогов, используемых в настоящем примере, приведены под SEQ ID NO: 4-10. Экспрессию белка подтверждали в ходе анализов FACS с антителами, специфичными в отношении соответствующих паралогов:

CLDN1: стоковый раствор крысиного антитела к клаудину-1 человека (конечная концентрация 5 мкг/мл): 100 мкг/мл, R&D, MAB4618;

CLDN2: мышиное Ab собственной разработки (1:100-200);

CLDN3: стоковый раствор мышиного антитела к клаудину-3 человека (конечная концентрация 5 мкг/мл): 500 мкг/мл, R&D, MAB4620;

CLDN4: стоковый раствор мышиного антитела к клаудину-4 человека (конечная концентрация 5 мкг/мл): 500 мкг/мл, R&D, MAB4219;

CLDN6: стоковый раствор мышиного антитела к клаудину-6 человека (конечная концентрация 5 мкг/мл): 500 мкг/мл, R&D, MAB3656;

CLDN9: стоковый раствор крысиного антитела к клаудину-9 человека (конечная концентрация 5 мкг/мл): 2 мг/мл, antibodies-online.com, ABIN1720917;

CLDN18.1: моноклональное мышиное Ab собственной разработки (конечная концентрация 5 мкг/мл).

Трансфицированные клетки CHO инкубировали в течение 60 мин при 4°C с соответствующим антителом (см. выше) в концентрации 5 мкг/мл, а затем с соответствующим конъюгированным с PE антителом козы к IgG мыши, специфичным к фрагменту Fc-гамма, конъюгированным с PE (1:100), Jackson 115-116-071, или антителом козы к IgG крысы, специфичным к фрагменту Fc-гамма, конъюгированным с PE (1:100), Jackson, 112-116-071, в течение 30 минут при 4°C.

Анализ проточной цитометрии проводили, как описано в примере 5. Результаты показаны на фигуре 6. Анализ подтвердил, что конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению, которую тестировали в этом анализе, не вступает в перекрестную реакцию с паралогами CLDN18.2 человека.

<u>Пример 7</u>

Цитотоксическая активность

Эффективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению в отношении перенаправления эффекторных T-клеток к клеткам-мишеням, экспрессирующим CLDN18.2, анализировали в различных анализах цитотоксичности in vitro:

- Эффективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 в отношении перенаправления стимулированных CD8+ эффекторных T-клеток человека к клеткам CHO, трансфицированным CLDN18.2 человека, измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS.
- Эффективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 в отношении перенаправления линии T-клеток макака к клеткам CHO, трансфицированным CLDN18.2

человека, измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS.

- Эффективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 в отношении перенаправления Т-клеток в нестимулированных PBMC человека к клеткам CHO, трансфицированным CLDN18.2 человека (наряду с отрицательным контролем с использованием клеток CHO, трансфицированных CLDN18.1 человека), измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS.
- Эффективность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 в отношении перенаправления Т-клеток в нестимулированных PBMC человека к линии CLDN18.2-положительных клеток рака желудка человека, например SNU-601 или SNU-620, измеряли в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS.

<u>Пример 7.1</u>

Анализ высвобождения хрома с использованием стимулированных Т-клеток человека

Стимулированные Т-клетки, обогащенные Т-клетками $CD8^+$, получали следующим образом. Чашку Петри (диаметр 145 мм) покрывали коммерчески доступным антителом, специфичным к CD3 (OKT3, ортоклон), в конечной концентрации 1 мкг/мл на 1 час при 37°C. Несвязанный белок удаляли посредством одной стадии промывания с помощью PBS. В предварительно покрытую чашку Петри добавляли 3-5x10^7 PBMC человека в 120 мл RPMI 1640 со стабилизированным глутамином/10% FCS/20 ед./мл IL-2 и стимулировали в течение 2 дней. На третий день клетки собирали и однократно промывали в RPMI 1640. Добавляли IL-2 до конечной концентрации 20 ед./мл, и клетки снова культивировали в течение одного дня в той же среде для культивирования клеток, которая описана выше. Обогащение цитотоксическими $CD8^+$ Т-лимфоцитами (CTL) выполняли путем истощения $CD4^+$ Т-клеток и $CD56^+$ NK-клеток с применением гранул Dynal согласно протоколу производителя.

Клетки-мишени CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека, дважды промывали с помощью PBS и метили с помощью 11,1 МБк ^{51}Cr в конечном объеме 100 мкл RPMI с 50% FCS в течение 60 минут при 37°C. После этого меченые клетки-мишени промывали 3 раза с помощью 5 мл RPMI и затем применяли в анализе цитотоксичности. Анализ проводили в 96-луночном планшете в общем объеме 200 мкл дополненной RPMI при соотношении E:T, составляющем 10:1. Применяли начальную концентрацию очищенной конструкции на основе антитела 0,01–1 мкг/мл и ее трехкратные разведения. Время инкубирования в анализе составляло 18 часов. Цитотоксичность определяли в виде относительных показателей высвобождаемого хрома в надосадочной жидкости по отношению к разнице между максимальным лизисом (добавление Triton-X) и спонтанным лизисом (без эффекторных клеток). Все измерения проводили в четырех повторностях. Измерение активности хрома в супернатантах выполняли с помощью гамма-счетчика. Анализ результатов проводили с помощью соответствующего программного обеспечения. Значения EC50, рассчитанные в программе анализа на основании сигмоидальных кривых зависимости "доза-эффект", применяли для сравнения цитотоксической активности.

Пример 7.2

Анализ цитотоксичности на основе FACS с использованием нестимулированных PBMC человека

Выделение эффекторных клеток

Получали мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла из обогащенных препаратов лимфоцитов (лейкоцитарных пленок). PBMC получали в день забора крови. После центрифугирования в градиенте плотности фиколла и процедур тщательного промывания в PBS Дульбекко оставшиеся эритроциты удаляли из PBMC путем инкубирования в буфере для лизиса эритроцитов (155 мМ NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$, 100 мкМ EDTA). Тромбоциты удаляли с надосадочной жидкостью после центрифугирования PBMC при 100 x g. Оставшиеся лимфоциты включали в себя главным образом B- и T-лимфоциты, NK-клетки и моноциты. PBMC выдерживали в культуре при 37°C/5% CO_2 в среде RPMI с 10% FCS.

Истощение $CD14^+$ и $CD56^+$ клеток

Для истощения $CD14^+$ клеток использовали микрогранулы с антителами к CD14 человека (Miltenyi Biotec, MACS, № 130-050-201). Для истощения NK клеток использовали микрогранулы с антителами к CD56 человека (Miltenyi Biotec, MACS, № 130-050-401). PBMC подсчитывали и центрифугировали в течение 10 мин при комнатной температуре при 300 x g. Супернатант удаляли и клеточный осадок ресуспендировали в буфере для выделения MACS (80 мкл/10^7 клеток; PBS, 0,5% (об./об.) FBS, 2 мМ EDTA). Микрогранулы с антителами к CD14 и микрогранулы с антителами к CD56 (20 мкл/10^7 клеток) добавляли и инкубировали в течение 15 мин при 4-8°C. Клетки промывали в буфере для выделения MACS (1-2 мл/10^7 клеток). После центрифугирования (см. выше) надосадочную жидкость сливали, а клетки ресуспендировали в буфере для выделения MACS (500 мкл/10^8 клеток). Затем выделяли CD14/CD56-отрицательные клетки с применением колонок LS (Miltenyi Biotec, № 130-042-401). PBMC без CD14+/CD56+ клеток культивировали в полной среде RPMI (т. е. RPMI1640, дополненной 10% FBS, 1x заменимыми аминокислотами, 10 мМ буфером Hepes, 1 мМ пируватом натрия и 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина) при 37°C в инкубаторе в течение необходимого времени.

Мечение клеток-мишеней

Для анализа клеточного лизиса в анализах проточной цитометрии применяли флуоресцентный краситель для мембран $DiOC_{18}$ (DiO) (Molecular Probes) для мечения клеток-мишеней (таких как клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека) и установления различий между ними и эффекторными клетками. Вкратце, клетки собирали, однократно промывали с помощью PBS и доводили до 10^6 клеток/мл в PBS, содержащем 2% (об./об.) FBS, и красителе для мембран DiO (5 мкл/10^6 клеток). После инкубирования в течение 3 мин при 37°C клетки дважды промывали в полной среде RPMI, и количество клеток доводили до $1,25 \times 10^5$ клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяли с помощью 0,5% (об./об.) изотонического раствора эозина G.

Анализ на основе проточной цитометрии

Данный анализ разрабатывали для количественной оценки лизиса клеток-мишеней (например, клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2 человека) в присутствии серийных разведений конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3. Смешивали равные объемы клеток-мишеней, меченных DiO, и эффекторных клеток (т. е. PBMC без клеток $CD14^{+}$), в результате чего получали соотношение клеток E:T, составляющее 10:1. В каждую лунку 96-луночного планшета переносили по 160 мкл этой суспензии. Добавляли 40 мкл серийных разведений подлежащих анализу конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 (и, возможно, конструкции на основе антител в качестве отрицательного контроля, как например конструкция на основе биспецифического антитела к CD3 на основе (I2C), распознающего нерелевантный целевой антиген) или полную среду RPMI в качестве дополнительного отрицательного контроля. Цитотоксическая реакция, опосредованная конструкциями на основе антител, продолжалась в течение 48 часов в инкубаторе с увлажненной атмосферой с 7% CO_2. Затем клетки переносили в новый 96-луночный планшет, и потерю целостности мембран клеток-мишеней отслеживали путем добавления йодида пропидия (PI) в конечной концентрации 1 мкг/мл. PI представляет собой не проникающий через мембрану краситель, который обычно не поступает в жизнеспособные клетки, тогда как мертвые клетки поглощают его и становятся идентифицируемыми с помощью флуоресцентного излучения.

Образцы измеряли с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCanto II и анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (оба продукта от Becton Dickinson). Клетки-мишени идентифицировали как DiO-положительные клетки. PI-отрицательные клетки-мишени относили к живым клеткам-мишеням. Процентное значение цитотоксичности рассчитывали согласно следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность } [\%] = \frac{n_{\text{мертвых клеток-мишеней}}}{n_{\text{клеток-мишеней}}} \times 100,$$

n=число событий.

С использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Graph Pad Software) процентное значение цитотоксичности откладывали на графике в зависимости от соответствующих концентраций конструкций на основе антител. Кривые зависимости "доза-эффект" анализировали с помощью четырехпараметрических логистических регрессионных моделей для оценивания сигмоидальных кривых зависимости "доза-эффект" с постоянным углом наклона, и осуществляли расчет значений EC50.

Пример 7.3

Эффективность перенаправления нестимулированных PBMC человека к клеткам-мишеням

Цитотоксическую активность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 анализировали с помощью 48-часового анализа цитотоксичности на основе FACS с использованием нестимулированных PBMC человека (CD14 отр./ CD56 отр.) в качестве эффекторных клеток, а также используя в качестве клеток-мишеней в соотношении E:T, составляющем 10:1:

(1) клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека,

(2) клетки CHO, трансфицированные CLDN18.1 человека, и

(3) клеточные линии SNU-601 и SNU-620 с естественной экспрессией.

Анализ проводили согласно описанному в примере 7.2. Результаты анализов цитотоксичности показаны в таблице 4.

Таблица 4. Значения EC50 [пМ] для конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3, измеренные в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS с нестимулированными PBMC человека в качестве эффекторных клеток. Клетки-мишени: (1) клетки CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека; (2) клетки CHO, трансфицированные CLDN18.1 человека; (3) SNU-601; (4) SNU-620

Клетки-мишени	**Конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3**	**EC50 [пМ]**
(1)	CL-1 x I2C-scFc	5,2
(1)	CL-1 x I2C-6His	0,5
(2)	CL-1 x I2C-scFc	99396
(2)	CL-1 x I2C-6His	1985
(3)	CL-1 x I2C-scFc	104
(3)	CL-1 x I2C-6His	2,3
(4)	CL-1 x I2C-scFc	185
(4)	CL-1 x I2C-6His	12

Анализ демонстрирует, что конструкции на основе антител по настоящему изобретению не проявляют значительной нежелательной цитотоксической активности в отношении клеток CHO, трансфицированных CLDN18.1, являющимся паралогом CLDN18.2 (строки выделены серым). В случае конструкции, обозначенной как "CL-1 x I2C-6His", коэффициент между значением EC_{50} для CLDN18.2-CHO и значением EC50 для CLDN18.1-CHO составляет почти 4,000. Более того, в случае конструкции, обозначенной как "CL-1 x I2C-scFc", коэффициент между значением EC_{50} для CLDN18.2-CHO и значением EC50 для CLDN18.1-CHO составляет почти 20,000.

Обычно ожидается, что значения EC_{50} будут ниже при использовании клеток-мишеней, которые экспрессируют более высокие уровни CLDN18.2 на поверхности клетки по сравнению с клетками-мишенями, для которых характерен более низкий уровень экспрессии мишени. Следовательно, обычно наблюдается, а также демонстрируется в настоящем анализе, что использование клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2, имеет тенденцию приводить к получению более низких значений EC_{50} по сравнению с использованием клеток с естественной экспрессией.

Пример 7.4

Эффективность перенаправления PBMC человека к клеткам-мишеням с естественной экспрессией

Цитотоксическую активность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению сравнивали с таковой других конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3, которые связываются с другим эпитопом в пределах мишени CLDN18.2 (CL-3 и CL-4, см. пример 2). Линии раковых клеток, стабильно экспрессирующих эндогенные уровни CLDN18.2 (GSU, NUGC, IM95, SNU620, SNU601), и клеточную линию AGS в качестве отрицательного контроля CLDN18.2 стабильно метили люциферазой (Luc). Кроме того, клетки CHO стабильно трансфицировали для сверхэкспрессии CLDN18.2. В качестве источника эффекторных клеток использовали двух людей-доноров T-клеток. Соотношение E:T в анализе цитотоксичности составляло 10:1. Предусматривающее соотношение 1:3 серийное титрование конструкций на основе антител начинали с концентрации 30 нМ. Аналитические образцы инкубированием в течение 48 часов при 37°C. Считывание показателей цитотоксичности выполняли с помощью системы анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega) для клеток, меченных Luc, и анализа жизнеспособности люминесцентных клеток CellTiter-Glo™ (Promega) для клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2.

За исключением последовательностей для связывающих CLDN18.2 областей VH и VL, конструкции на основе антител CL-3 и CL-4 были идентичны конструкциям на основе антител по настоящему изобретению, проанализированным в анализах цитотоксичности, представленным в настоящем примере. Области VH и VL двух конструкций на основе антител CL-3 и CL-4 раскрыты под SEQ ID NO: 8+15 и SEQ ID NO: 6+11 соответственно в WO 2014/075788. См. также SEQ ID NO: 145+146 и SEQ ID NO: 150+151, раскрытые в данном документе.

Результаты показаны в таблице 5 ниже и на фигуре 7. Независимо от клеток-мишеней конструкции на основе антител по настоящему изобретению (в данном случае CL-1, CL-2) демонстрировали наличие значительно более высокой цитотоксической активности, чем конструкции на основе антител, связывающиеся с другим эпитопом CLDN18.2 (CL-3, CL-4). В то время как конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрируют значения EC_{50} в двузначном пикомолярном диапазоне, сравнительные конструкции демонстрируют значения EC_{50} в варьирующемся от трехзначного вплоть до пятизначного пикомолярном диапазоне. Ни одна из конструкций не демонстрировала активность применительно к отрицательной в отношении мишени клеточной линии (данные не показаны).

Таблица 5. Значения EC_{50} [пМ] для конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3, измеренные в 48-часовом анализе цитотоксичности

Целевая клетка	**CL-1 x I2C-scFc**	**CL-2 x I2C-scFc**	**CL-3 x I2C-scFc**	**CL-4 x I2C-scFc**
GSU	7,4 ± 0,3	12,1 ± 0,7	360,3 ± 47,2	1655,5 ± 71,5

IM95	16,0 ± 2,7	21,4 ± 4,2	623,1 ± 93,3	5900,0 ± 514,0
NUGC4	117,1 ± 46,2	97,1 ± 35,1	1196,5 ± 426,4	>30000
SNU-601	61,9 ± 6,9	64,7 ± 6,7	13797,5 ± 4169,5	>30000
SNU-620	29,0 ± 3,6	31,0 ± 5,3	557,1 ± 98,4	11093,5 ± 1996,5
CHO-CLDN18.2	13,6 ± 0,1	13,2 ± 0,5	440,2 ± 112,5	3181,0 ± 119,0

Чтобы исключить возможность того, что эти наблюдения были обусловлены значительно более высокой аффинностью конструкций на основе антител по настоящему изобретению (в данном случае CL-1, CL-2) по сравнению с контрольными конструкциями (в данном случае CL-3), проводили клеточный анализ аффинности с использованием клеток CHO, трансфицированных Cldn18.2 человека. Было показано, что значения аффинности для трех протестированных конструкций CL-1, CL-2 и CL-3 находились в очень схожем диапазоне. Это означает, что благоприятное соотношение эпитоп/активность, продемонстрированное для конструкций на основе антител по настоящему изобретению, не связано с тем, что контрольные конструкции просто характеризуются более низкой аффинностью и, следовательно, демонстрируют более низкую цитотоксическую активность. Напротив, эффективность, по-видимому, обусловлена конкретным эпитопом в пределах CLDN18.2, который распознается конструкциями на основе антител по настоящему изобретению.

Пример 7.5

Эффективность перенаправления Т-клеток макаков к клеткам CHO, экспрессирующим CLDN18.2

Цитотоксическую активность конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 анализировали в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2 человека, в качестве клеток-мишеней и линии Т-клеток макака 4119LnPx (Knappe et al. Blood 95: 3256-61 (2000)) в качестве источника эффекторных клеток при соотношении E:T, составляющем 10:1. Следует отметить, что CLDN18.2 человека и яванского макака характеризуются идентичной аминокислотной последовательностью в пределах внеклеточных доменов. Мечение клеток-мишеней, представляющих собой клетки CHO, и анализ цитотоксической активности на основе проточной цитометрии осуществляли согласно описанному выше в примере 7.2.

Результаты представлены в таблице 6. Т-клетки макака из клеточной линии 4119LnPx подвергали индукции для эффективного уничтожения трансфицированных CLDN18.2 клеток CHO с помощью конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3 по настоящему изобретению. В этом анализе конструкции на основе антител показали высокую эффективность со значениями EC50, варьирующимися в диапазоне от 1-значных до 2-значных пикомолярных величин, что подтверждает их высокую активность в системе на основе клеток макака.

Таблица 6. Значения EC50 [пМ] для конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3, измеренные в 48-часовом анализе цитотоксичности на основе FACS с использованием линии Т-клеток макака 4119LnPx в качестве эффекторных клеток и клеток CHO, трансфицированных CLDN18.2 человека, в качестве клеток-мишеней

Конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3	**EC50 [пМ]**
CL-1 x I2C-scFc	38
CL-1 x I2C-6His	7,2

Пример 8

Преобразование мономера в димер после (i) трех циклов замораживания/оттаивания и (ii) 7 дней инкубации при 37°C

Мономерные конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 подвергали различным стрессовым условиям с последующей высокоэффективной SEC для определения процентного содержания изначально мономерной конструкции на основе антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию на основе антитела.

(i) 25 мкг мономерной конструкции на основе антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл с помощью буфера генерического состава и затем замораживали при -80°C на 30 мин с последующим оттаиванием в течение 30 мин при комнатной температуре. После трех циклов замораживания/оттаивания определяли содержание димеров с помощью HP-SEC.

(ii) 25 мкг мономерной конструкции на основе антитела доводили до концентрации 250 мкг/мл с помощью буфера генерического состава с последующей инкубацией при 37°C в течение 7 дней. Содержание димеров определяли посредством HP-SEC.

Колонку на основе диоксида кремния для высокоэффективной (HP) эксклюзионной жидкостной хроматографии (SEC) подсоединяли к прибору для FPLC, снабженному автоматическим пробоотборником. Подвижный и уравновешивающий буфер для колонки состоял из 100 мМ KH_2PO_4–200 мМ Na_2SO_4, доведенных до pH 6,6. В уравновешенную колонку вносили раствор конструкций на основе антител (25 мкг белка), и проводили элюирование при скорости потока 0,75 мл/мин при максимальном давлении 7 МПа. Полный прогон отслеживали при оптическом поглощении при 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика для сигнала при 210 нМ, зарегистрированного в оценочном листе прогона в программном обеспечении. Содержание димеров рассчитывали путем деления площади пика димера на суммарную площадь пиков мономера и димера.

Результаты показаны в таблице 7 ниже. Анализируемые конструкции на основе антител к CLDN18.2xCD3 имели процентное содержание димера, составляющее 0,0%, после трех циклов замораживания/оттаивания и значения процентного содержания димера, составляющие ≤2%, после 7 дней инкубации при 37°C.

Таблица 7. Процентное содержание мономерных относительно димерных конструкций на основе антител к CLDN18.2xCD3, определенное с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC)

Конструкция на основе антитела к CLDN18.2xCD3	**Процентное содержание димера после трех циклов замораживания/оттаивания**	**Процентное содержание димера после 7 дней инкубации при 37°C**
CL-1 x I2C-scFc	0,0	0,0
CL-1 x I2C-6His	0,72	0,0

Пример 9

Термостабильность

Температуру агрегации антител определяли следующим образом: 40 мкл раствора конструкций на основе антител в концентрации 250 мкг/мл переносили в одноразовую кювету и помещали в устройство для исследования методом динамического рассеяния света. Образец нагревали от 40°C до 70°C при скорости нагрева 0,5°C/мин с постоянным измерением определяемого радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление белка и агрегацию, использовалось пакетом программного обеспечения, поставляемым с устройством DLS, для расчета температуры агрегации конструкции на основе антитела.

Было показано, что конструкция на основе антитела CL-1 x I2C-scFc характеризуется благоприятной температурой агрегации ≥51°C, более конкретно, 51,7°C. В отдельном анализе было показано, что температура агрегации молекулы, обозначенной как CL-1 x I2C-6His, имеет значение ≥45°C, более конкретно, 49,7°C.

Пример 10

Мутность при концентрации мономерной конструкции на основе антитела 2,5 мг/мл

1 мл раствора очищенных конструкций на основе антител с концентрацией 250 мкг/мл концентрировали центрифугированием до 2500 мкг/мл. После 16 часов хранения при 5°C мутность раствора определяли измерением оптического поглощения при OD340 нм относительно буфера генерического состава.

Было показано, что конструкция на основе антитела CL-1 x I2C-scFc имеет очень благоприятную мутность ≤ 0,021, в то время как CL-1 x I2C-6His имеет очень благоприятную мутность ≤ 0,029. Аналогичное измерение мутности после трех циклов замораживания/оттаивания привело к получению значения мутности, составляющего 0,021 для CL-1 x I2C-scFc.

Пример 11

Однородность белка по данным катионообменной хроматографии высокого разрешения

Гомогенность белков конструкций на основе антител по настоящему изобретению анализировали с помощью катионообменной хроматографии высокого разрешения

(CIEX).

В одном анализе 50 мкг мономера конструкции на основе антитела разбавляли 50 мл связывающего буфера А (20 мМ дигидрофосфата натрия, 30 мМ NaCl, 0,01% октаната натрия, pH 5,5), и 40 мл этого раствора наносили на 1 мл колонку BioPro SP-F (YMC, Германия), подключенную к устройству для проведения FPLC. После связывания образца проводили стадию промывки дополнительным количеством связывающего буфера. Для элюирования белка линейный возрастающий солевой градиент с использованием буфера В (20 мМ дигидрофосфата натрия, 1000 мМ NaCl, 0,01% октаната натрия, pH 5,5) до 50%-ного буфера В применяли по отношению к 10 объемам колонки. Полный прогон отслеживали при оптическом поглощении при 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика для сигнала при 280 нМ, зарегистрированного в оценочном листе прогона в программном обеспечении. В этом анализе было продемонстрировано, что значение гомогенности молекулы, обозначенной как "CL-1 x I2C-6His" (SEQ ID NO: 131), составляло 82,5%.

В другом анализе аналитическую колонку для CIEX Bio SCX (Agilent, Франкфурт, Германия) подключали к устройству для проведения UPLC (Waters, Eschborn, Германия) и уравновешивали буфером А (связывающий буфер), состоящим из 50 мМ MES, pH 5,6, 0,05% азида натрия. 10 мкг мономера конструкции на основе антитела вносили в колонку и обеспечивали связывание с матрицей колонки. После связывания образца проводили стадию промывки дополнительным количеством связывающего буфера В. Для элюирования белка применяли линейный возрастающий солевой градиент с использованием буфера В, состоящего из 50 мМ MES, 1000 мМ хлорида натрия, pH 5,6, 0,05% азида натрия, до 50% процентов буфера В. Полный прогон отслеживали при оптическом поглощении при 280 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика для сигнала при 280 нМ, зарегистрированного в оценочном листе прогона в программном обеспечении. В этом анализе было продемонстрировано, что значение гомогенности молекулы, обозначенной как "CL-1 x I2C-scFc" (SEQ ID NO: 132), составило 97,6% (площадь под кривой (= AUC) основного пика).

<u>Пример 12</u>

Гидрофобность поверхности, измеренная с помощью HIC с бутилом

Гидрофобность поверхности конструкций на основе антител CL-1 x I2C-scFc и CL-1 x I2C-6His тестировали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия HIC в проточном режиме.

50 мкг мономерной конструкции на основе антитела разбавляли буфером генерического состава до конечного объема 500 мкл (10 мМ лимонной кислоты, 75 мМ лизин-HCl, 4% трегалозы, pH 7,0) и вносили в колонку с бутил-сефарозой FF объемом 1 мл, подключенную к системе для проведения FPLC Äkta Purifier. Полный прогон отслеживали при оптическом поглощении при 280, 254 и 210 нм. Анализ выполняли путем интегрирования пика для сигнала при 280 нМ, зарегистрированного в оценочном листе прогона в программном обеспечении Äkta Unicorn. Характеристики элюирования

оценивали путем сравнения площади и скорости нарастания и спада сигнала белка, что тем самым указывало на силу взаимодействия конструкции на основе антитела с матрицей.

Конструкция на основе антитела имела хорошие характеристики элюирования, которое было быстрым и полным.

Пример 13

Оценка эффективности конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 в модели рака желудка на поздней стадии GSU-luc на мышах NOD/SCID

Противоопухолевую активность конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3, характеризующейся SEQ ID NO: 132 (CL-1 x I2C-scFc), исследовали в модели на самках мышей NOD/SCID, которым в день 1 подкожно инъецировали $5x10^6$ клеток GSU-luc (люцифераза). $2x10^7$ эффекторных клеток (размноженных in vitro и активированных $CD3^+$ Т-клеток человека) вводили внутрибрюшинно в день 8. Обработку проводили в дни 12, 19 и 26 (Q7Dx3). Две контрольные группы, одну без введения Т-клеток (группа 1), другую с введением Т-клеток (группа 2), обрабатывали посредством 0,1 мл/введение среды-носителя (25 мМ L-лизин, 0,002% (вес/об.) полисорбата 80 в 0,9% (вес/об.) хлорида натрия при pH 7,0) путем внутривенных болюсных инъекций. Конструкцию на основе антитела вводили в концентрации 1 мг/кг/введение путем внутривенных болюсных инъекций в конечном объеме 0,1 мл (группа 3). Количество мышей в группе составляло 5 (группа 1), 10 (группа 2) и 10 (группа 3).

Опухоли измеряли штангенциркулем в ходе исследования, и прогрессирование оценивали путем межгруппового сравнения объемов опухолей (TV). Показатель подавления роста опухоли T/C [%] в день x определяли путем вычисления объема опухоли как T/C (%) = 100 x (медианное значение TV для анализируемой группы) / (медианное значение TV для контрольной группы), а вычисленные значения приведены в таблице 8.

Таблица 8. Значения T/C [%] для модели рака желудка на поздней стадии GSU-luc на мышах NOD/SCID "Медиана" = медианный объем опухоли в анализируемой группе

День исследования	**Группа 2**			**Группа 3**		
	Медиана	**n**	**T/C [%]**	**Медиана**	**n**	**T/C [%]**
11	208	10	100	208	10	100
13	275	10	100	316	10	115
15	430	10	100	369	10	86
18	695	10	100	185	10	27
20	891	10	100	123	10	14
22	896	4	100	79	10	9
25	1373	2	100	52	9	4

Результаты дополнительно показаны на фигуре 8. Значительное подавление роста опухоли было продемонстрировано в модели на мышах NOD/SCID в настоящем анализе опухоли на поздней стадии. Кроме того, обработка конструкцией на основе антитела к CLDN18.2xCD3 не оказывала влияния на вес тела мышей (данные не показаны).

Пример 14

Оценка противоопухолевой активности конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 в ксенотрансплантатной модели образования опухоли SNU620-luc на самках бестимусных голых мышей

Противоопухолевую активность конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3, характеризующейся SEQ ID NO: 132 (CL-1 x I2C-scFc), исследовали в модели на самках бестимусных голых мышей, которым в день 1 подкожно вводили смесь SNU620-luc ($5x10^6$ клеток-мишеней) / PBMC ($2,5x10^6$ эффекторных клеток) в 50% матригеле. Обработку групп 1-4 проводили в дни 3, 10 и 17 (Q7D). Контрольную группу, которая получала смесь опухолевые клетки/PBMC (группа 1), обрабатывали средой-носителем (25 мМ L-лизина, 0,002% (вес/об.) полисорбата 80 в 0,9% (вес/об.) хлорида натрия при pH 7,0) в количестве 0,1 мл/введ. путем внутривенных болюсных инъекций. Конструкцию на основе антитела вводили в концентрации 1 мг/кг/введ. (группа 2), 0,1 мг/кг/введ. (группа 3) и 0,01 мг/кг/введ. (группа 4) в виде внутривенных болюсных инъекций в объеме 0,1 мл. Количество мышей на группу составляло 10.

Опухоли измеряли штангенциркулем в ходе исследования, и прогрессирование оценивали путем межгруппового сравнения объемов опухолей (TV). Показатель подавления роста опухоли T/C [%] в день x определяли путем вычисления объема опухоли как T/C (%) = 100 x (медианное значение TV для анализируемой группы) / (медианное значение TV для контрольной группы), а вычисленные значения приведены в таблице 9.

Таблица 9. Значения T/C [%] для ксенотрансплантатной модели образования опухоли SNU620-luc на самках бестимусных голых мышей. "Медиана" = медианный объем опухоли в анализируемой группе

День	**Группа 1**		**Группа 2**		**Группа 3**		**Группа 4**		**Группа 5**	
	Медиана	T/C [%]	Медиана	T/C [%]	Медиана	T/C [%]	Медиана	T/C [%]	Медиана	T/C [%]
5	142	100	97	68	107	76	148	104	156	110
8	196	100	53	27	96	49	110	56	180	91
10	231	100	34	15	51	22	83	36	217	94
12	274	100	21	8	29	11	46	17	168	61
15	321	100	13	4	19	6	27	8	70	22
17	353	100	10	3	13	4	21	6	44	12
19	448	100	8	2	11	2	16	4	53	12
22	552	100	7	1	10	2	15	3	64	12

Результаты дополнительно показаны на фигуре 9. Значительное подавление роста опухоли было продемонстрировано в модели на бестимусных голых мышах для всех протестированных концентраций конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3. Кроме того, обработка конструкцией на основе антитела к CLDN18.2xCD3 не оказывала влияния на вес тела мышей (данные не показаны).

Пример 15

Поисковое токсикологическое исследование на макаках

Поисковое исследование переносимости NHP проводили с использованием конструкции на основе антитела к CLDN18.2xCD3 CL-1 x I2C-6His (SEQ ID NO: 131) путем внутривенного введения. Величины системного воздействия, достигнутые после начальной дозы 25 мкг/кг/день (~ 20x EC90 человека), переносились хорошо. Повышение дозы до 125 мкг/кг/день (~ 120x EC90 человека) приводило к клиническим, а также гистопатологическим эффектам, ожидаемым от рекрутирующей Т-клетки конструкции на основе антитела, нацеливающейся на CLDN18.2.

Пример 16

Исследования комбинированной терапии in vitro

Обработка с помощью CL-1xI2C-scFc активирует Т-клетки человека, что приводит к повышению уровней PD-1 на Т-клетках (данные не показаны). Обработка также может приводить к повышению уровней PD-L1 на опухолевых клетках. Для сверхэкспрессии PD-L1 конструировали линии клеток рака желудка GSU и NUG-C4, которые являются CLDN18.2-положительными. Клетки инкубировали с CL-1xI2C-scFc и с активированными Т-клетками человека в отсутствие или в присутствии антитела к PD-1, характеризующегося аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 360, и аминокислотной последовательностью легкой цепи, приведенной под SEQ ID NO: 361. Цитотоксичность оценивали после 24-часовой инкубации. Результаты показаны в таблице 10 ниже.

Таблица 10. Полученные в ходе двух отдельных анализов цитотоксичности значения EC_{50} и EC_{90} [пМ] для каждой из двух разных клеточных линий

	GSU		NUG-C4	
	EC_{50}	EC_{90}	EC_{50}	EC_{90}
CL-1xI2C-scFc отдельно	52,8 ± 9,4	168,0 ± 77,7	168,0 ± 85,1	712 ± 91,7
CL-1xI2C-scFc + ab к PD-1	28,1 ± 10,7	83,4 ± 45,0	63,9 ±57,0	219,9 ± 77,2

Этот анализ демонстрирует, что добавление антитела к PD-1 увеличивает эффективность конструкций на основе антител к CD3xCLDN18.2 по настоящему изобретению.

Пример 17

Исследования комбинированной терапии на мышах

С применением модели на мышах с нокином химерного CD3-эпсилон человека/мыши оценивали терапевтические комбинации антител/конструкций на основе антител в отношении потенциального повышения эффективности конструкций на основе биспецифических антител, как описано в данном документе. Получали конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного суррогатного антитела к CD3 человека ("I2C" scFv) x (scFv)-scFc к CLDN18.2 мыши. Эта молекула демонстрировала сильную активность in vitro в отношении клеток мыши, экспрессирующих CLDN18.2. Затем эту молекулу тестировали в модели на генетически модифицированных иммунокомпетентных мышах (нокин химерного CD3-эпсилон человека/мыши) в отношении ее противоопухолевой активности в комбинации с антителом к PD-1 мыши, антителом к CTLA4 мыши и антителом к 4-1BB (CD137) мыши против CLDN18.2-положительных подкожно имплантированных опухолей (сингенная модель B16F10 muCLDN18.2). Согласно плану исследования мышей, характеризующихся объемом опухоли приблизительно 50-100 мм^3, рандомизировали в день 10. В каждую группу включали по десять мышей. Конструкцию на основе антитела к CD3xCLDN18.2 (150 мкг/кг) или контрольную (антитело к CD3 x к EGFRvIII, 150 мкг/кг) конструкцию на основе биспецифического антитела вводили (в/в) в дни 11 и 18, а антитела (100 мкг антитела к PD-1; 150 мкг антитела к 4-1BB; 300 мкг антитела к CTLA4; антитело изотипического контроля) вводили в дни 11, 14, 17 и 20. Объемы опухолей измеряли в дни 10, 13, 17, 20 и 25 (конечный сбор материала, все группы).

Все три вида антител повышали эффективность биспецифической конструкции. Агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB не продемонстрировало активности в качестве отдельного противоопухолевого средства в отношении CLDN18.2-положительных опухолей. В частности, подавление роста опухоли (TGI) в день 25 определяли указанным далее образом.

Контрольная конструкция на основе биспецифического антитела+антитело изотипического контроля → 0% (стандарт)

Контрольная конструкция на основе биспецифического антитела+антитело к 4-1BB → не существенное

Контрольная конструкция на основе биспецифического антитела+антитело к CTLA-4 → 21%

Конструкция на основе антитела к CD3xCLDN18.2+антитело изотипического контроля → 36%

Контрольная конструкция на основе биспецифического антитела+антитело к PD-1 → 57%

Конструкция на основе антитела CD3xCLDN18.2+антитело к CTLA-4 → 76%

Конструкция на основе антитела CD3xCLDN18.2+антитело к 4-1BB → 77%

Конструкция на основе антитела CD3xCLDN18.2+антитело к PD-1 → 79%

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция на основе антитела, содержащая:

• первый домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени, и

• второй домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, где

первый домен связывается с тем же эпитопом CLDN18.2, что и антитело или конструкция на основе антитела, содержащие домен, который связывается с CLDN18.2 на поверхности клетки-мишени и который содержит:

a) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 123, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 126;

b) VH-область, содержащую CDR-H1, приведенную под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенную под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенную под SEQ ID NO: 135, и VL-область, содержащую CDR-L1, приведенную под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенную под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенную под SEQ ID NO: 138;

c) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 127, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 128; или

d) VH-область, приведенную под SEQ ID NO: 139, и VL-область, приведенную под SEQ ID NO: 140.

2. Конструкция на основе антитела по п. 1, где второй домен связывается с CD3-эпсилон человека и с CD3-эпсилон Callithrix jacchus или Saimiri sciureus.

3. Конструкция на основе антитела по п. 1 или п. 2, где:

a) конструкция на основе антитела представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела,

b) первый домен находится в формате scFv,

c) второй домен находится в формате scFv,

d) первый и второй домены связаны посредством линкера и/или

e) конструкция на основе антитела содержит домен, обеспечивающий увеличенный период полужизни в сыворотке крови.

4. Конструкция на основе антитела по любому из предыдущих пунктов, где первый домен не связывается или не связывается в значительной степени с CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 и/или CLDN9.

5. Конструкция на основе антитела по любому из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-область, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

a) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 121, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 122, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 123, CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 124, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 125, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 126; и

b) CDR-H1, приведенной под SEQ ID NO: 133, CDR-H2, приведенной под SEQ ID NO: 134, и CDR-H3, приведенной под SEQ ID NO: 135, и CDR-L1, приведенной под SEQ ID NO: 136, CDR-L2, приведенной под SEQ ID NO: 137, и CDR-L3, приведенной под SEQ ID NO: 138.

6. Конструкция на основе антитела по любому из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139.

7. Конструкция на основе антитела по одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VL-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140.

8. Конструкция на основе антитела по одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит VH-область и VL-область, имеющие аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 127+128 или SEQ ID NO: 139+140.

9. Конструкция на основе антитела по одному из предыдущих пунктов, где первый домен содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 129 или SEQ ID NO: 141.

10. Конструкция на основе антитела по одному из предыдущих пунктов, содержащая или состоящая из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 143 и SEQ ID NO: 144.

11. Полинуклеотид, кодирующий конструкцию на основе антитела по любому из предыдущих пунктов.

12. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 11.

13. Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом по п. 11 или вектором по п. 12.

14. Способ получения конструкции на основе антитела по любому из пп. 1-10, при этом указанный способ предусматривает культивирование клетки-хозяина по п. 13 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанной конструкции на основе антитела, и извлечение полученной конструкции на основе антитела из культуры.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию на основе антитела по любому из пп. 1-10 или полученную согласно способу по п. 14.

16. Конструкция на основе антитела по любому из пп. 1-10 или полученная согласно способу по п. 14 для применения в предупреждении, лечении или уменьшении тяжести заболевания, предпочтительно новообразования.

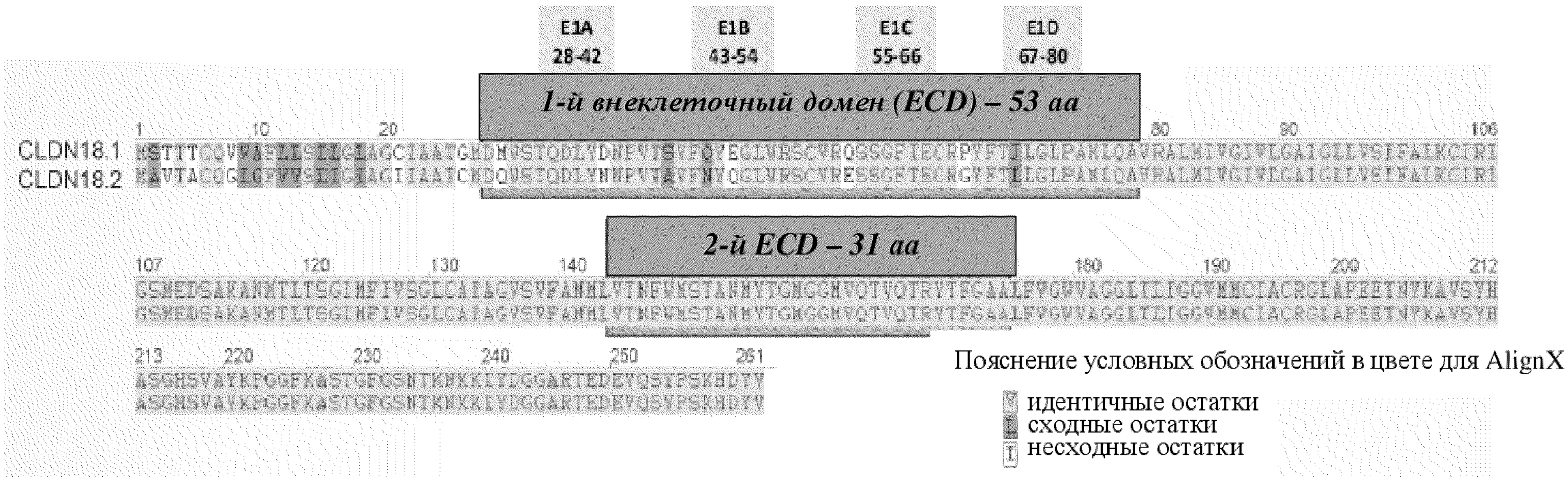
17. Конструкция на основе антитела по п. 16, где заболевание или новообразование выбрано из группы, состоящей из рака желудочно-кишечного тракта, рака яичника и рака легкого.

18. Конструкция на основе антитела по п. 17, где рак желудочно-кишечного тракта выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, гастроэзофагеального рака, рака поджелудочной железы и колоректального рака.

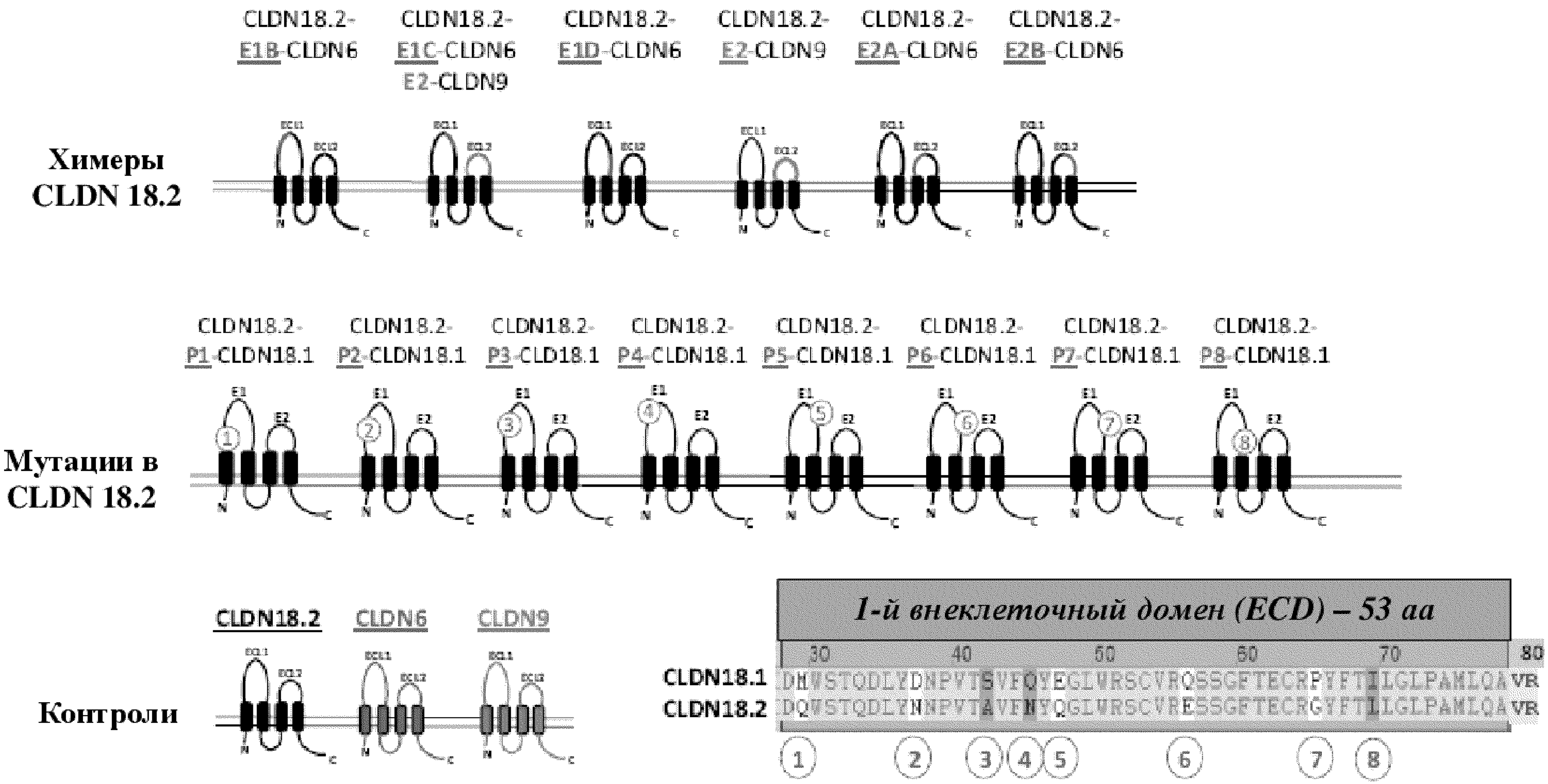
19. Набор, содержащий конструкцию на основе антитела по любому из пп. 1-10, конструкцию на основе антитела, полученную согласно способу по п. 14, полинуклеотид по п. 11, вектор по п. 12 и/или клетку-хозяина по п. 13.

По доверенности

Фигура 1

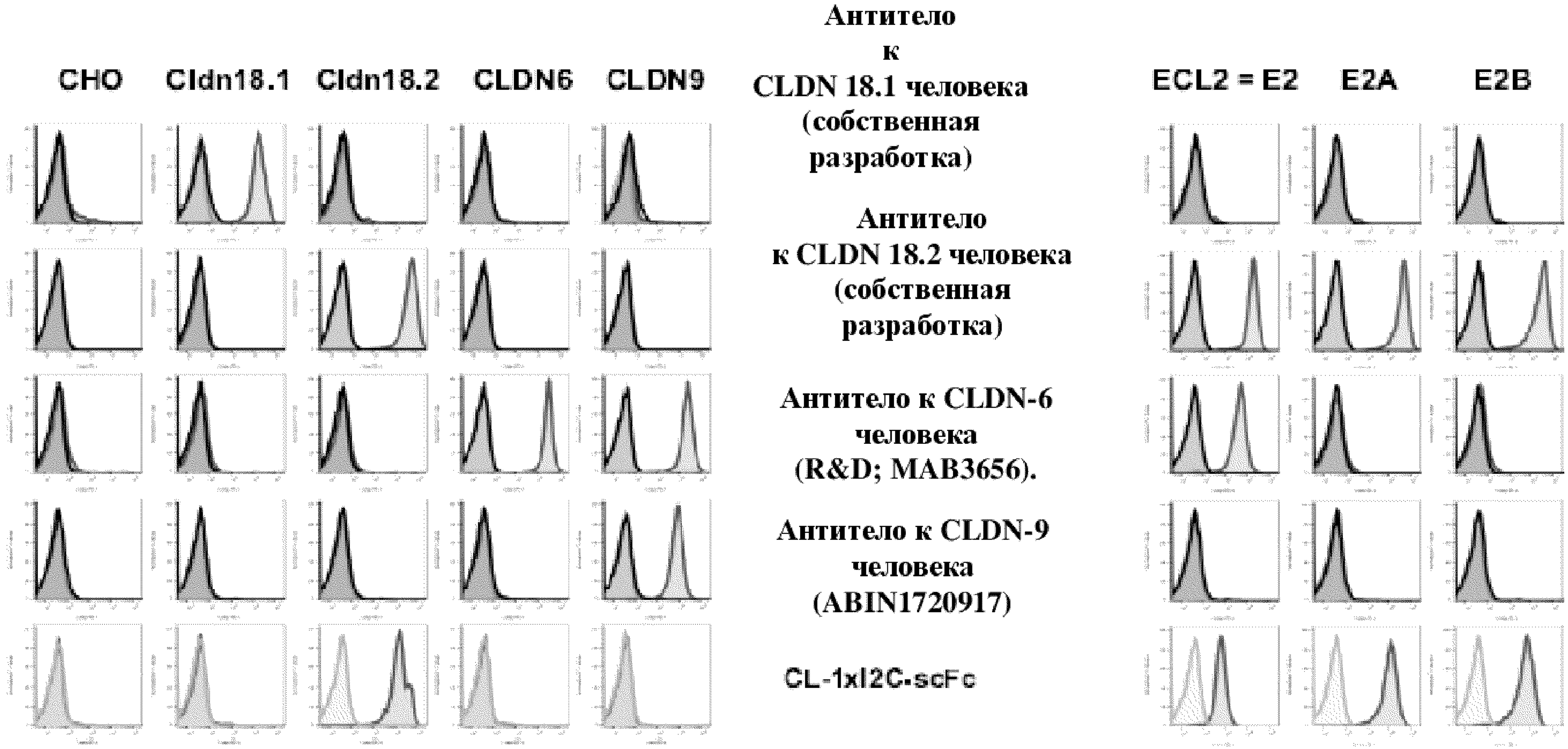

E1A
28-42
E1B
43-54
E1C
55-66
E1D
67-80
1-й внеклеточный домен (ECD) – 53 аа
2-й ECD – 31 аа
CLDN18.1
CLDN18.2
Пояснение условных обозначений в цвете для AlignX
идентичные остатки
сходные остатки
несходные остатки

Фигура 2

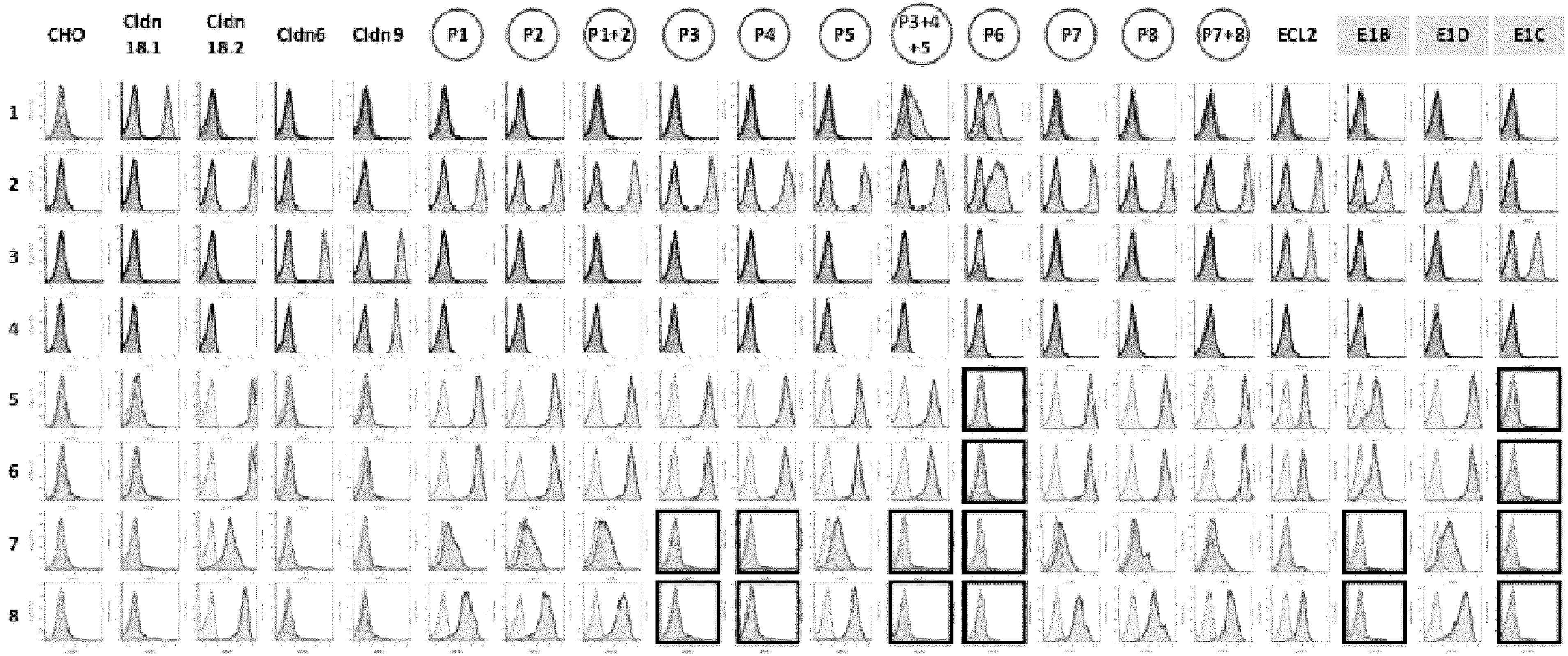


Химеры CLDN 18.2
CLDN18.2-E1B-CLDN6
CLDN18.2-E1C-CLDN6 E2-CLDN9
CLDN18.2-E1D-CLDN6
CLDN18.2-E2-CLDN9
CLDN18.2-E2A-CLDN6
CLDN18.2-E2B-CLDN6
Мутации в CLDN 18.2
CLDN18.2-P1-CLDN18.1
CLDN18.2-P2-CLDN18.1
CLDN18.2-P3-CLD18.1
CLDN18.2-P4-CLDN18.1
CLDN18.2-P5-CLDN18.1
CLDN18.2-P6-CLDN18.1
CLDN18.2-P7-CLDN18.1
CLDN18.2-P8-CLDN18.1
Контроли
CLDN18.2
CLDN6
CLDN9
1-й внеклеточный домен (ECD) – 53 aa
30 40 50 60 70 80
CLDN18.1 DHWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWRSCVRQSSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVR
CLDN18.2 DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVR
1 2 3 4 5 6 7 8

Фигура 3


CHO
Cldn18.1
Cldn18.2
CLDN6
CLDN9
ECL2 = E2
E2A
E2B
Антитело к CLDN 18.1 человека (собственная разработка)
Антитело к CLDN 18.2 человека (собственная разработка)
Антитело к CLDN-6 человека (R&D; MAB3656).
Антитело к CLDN-9 человека (ABIN1720917)
CL-1xI2C-scFc

Фигура 4



CHO
Cldn 18.1
Cldn 18.2
Cldn6
Cldn 9
P1
P2
P1+2
P3
P4
P5
P3+4 +5
P6
P7
P8
P7+8
ECL2
E1B
E1D
E1C
1
2
3
4
5
6
7
8

CHO, трансфицированные CLDN18.2 человека

HPB-ALL

LnPx 4119

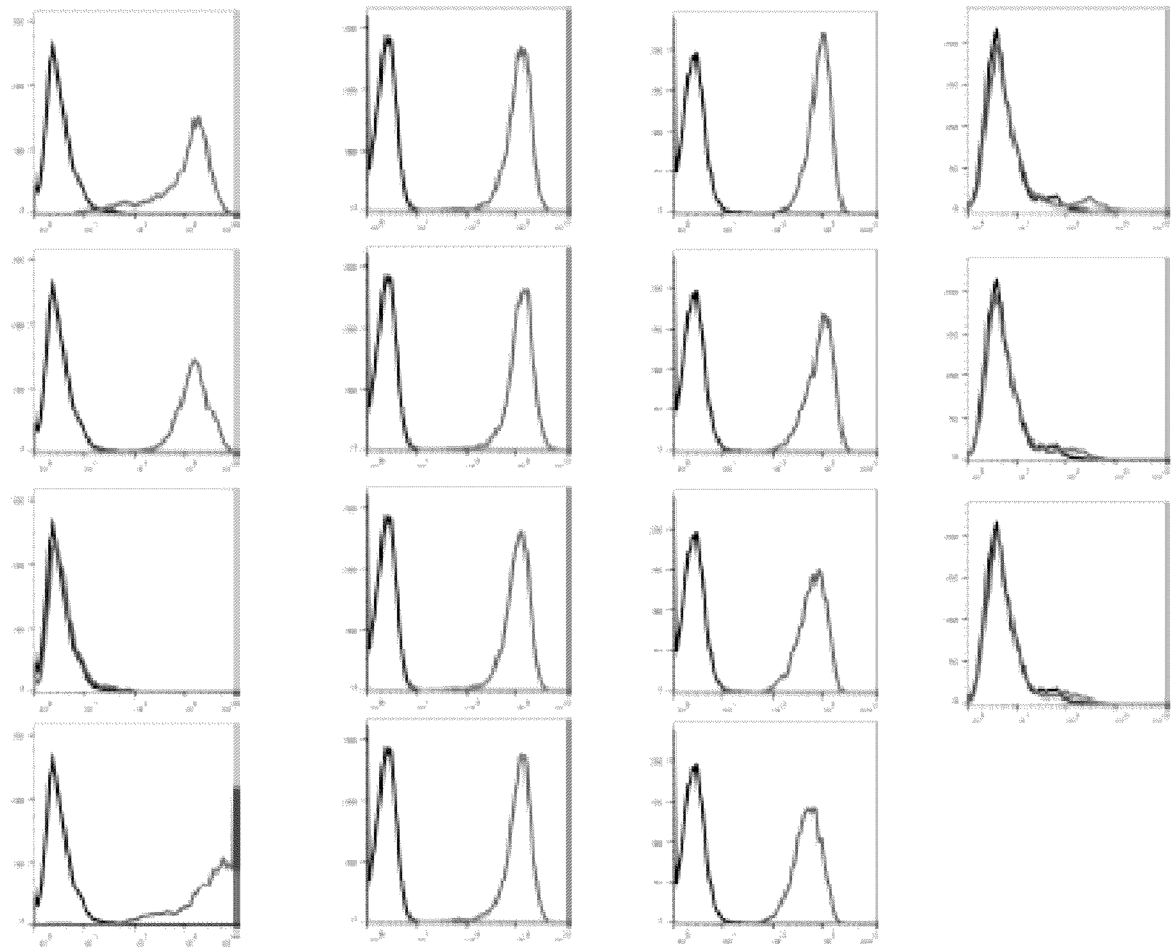
Нетрансфицир. CHO

CL-1 x I2C-His6

CL-1 x I2C-scFc

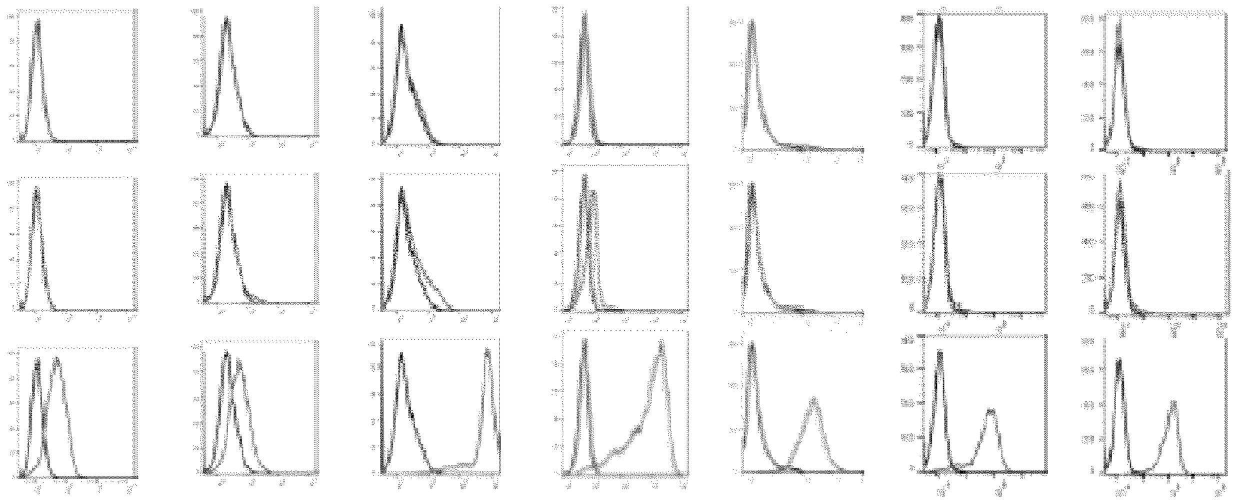
Контроль: конструкция на основе антитела к EGFRvIIIxI2C-scFc

Положительный контроль (экспрессия мишени)

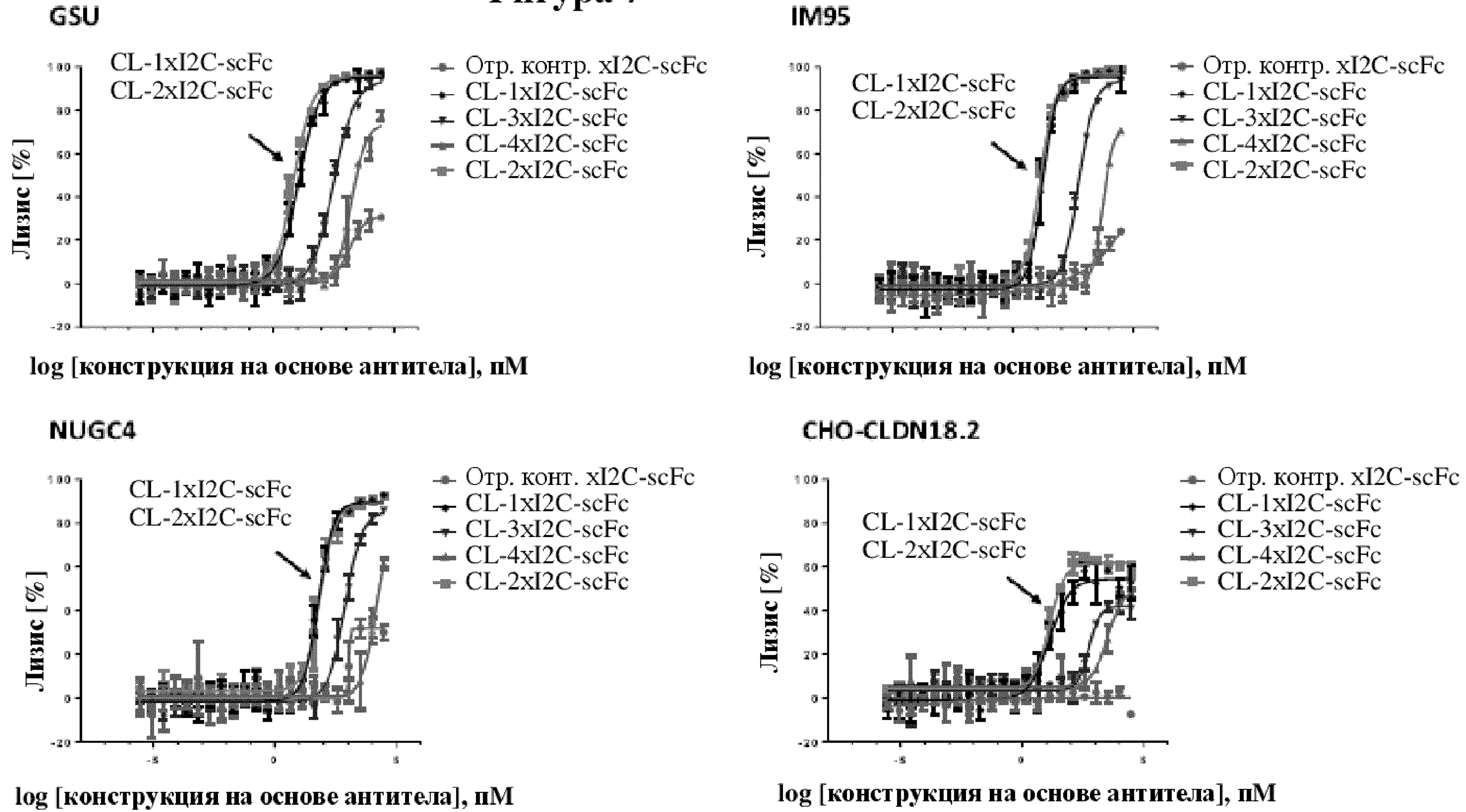


Фигура 5

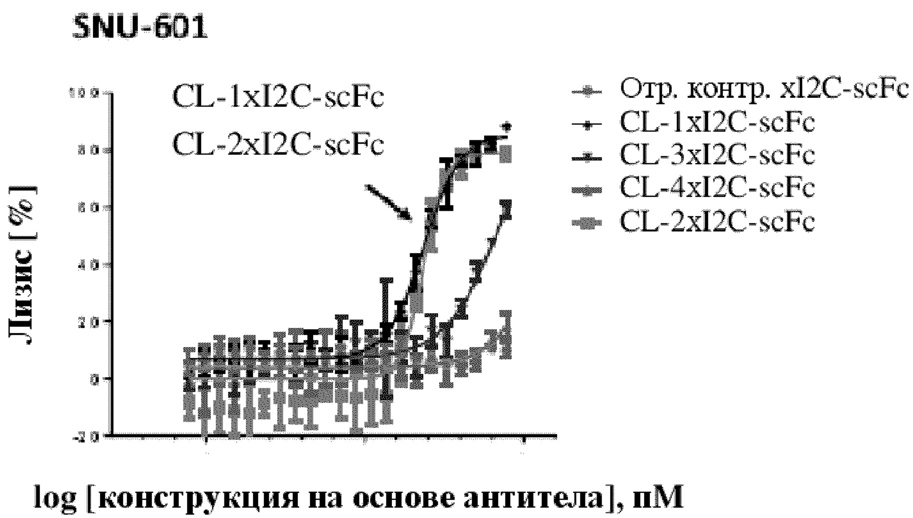
Фигура 6

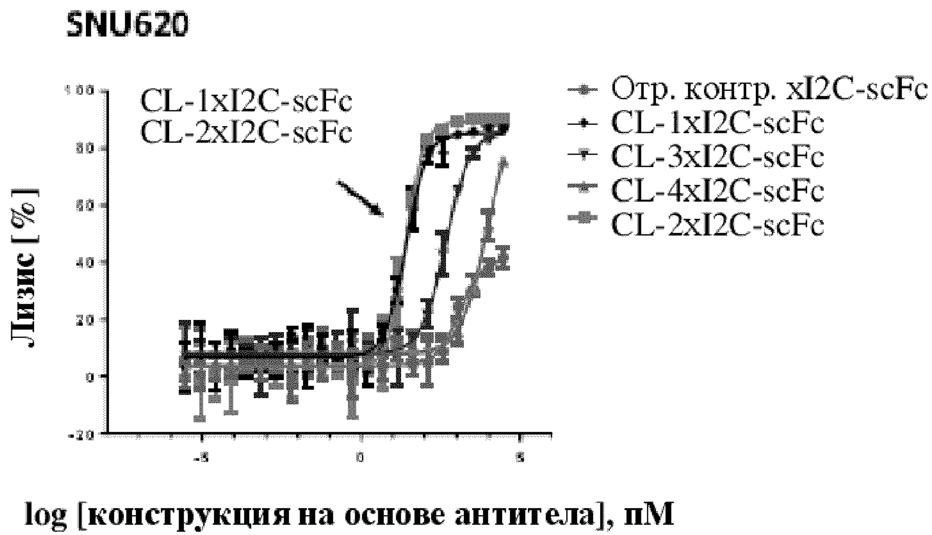

CHO, трансфицир. CLDN1 чел.
CHO, трансфицир. CLDN2 чел.
CHO, трансфицир CLDN3 чел.
CHO, трансфицир. CLDN4 чел.
CHO, трансфицир. CLDN6 чел.
CHO, трансфицир. CLDN9 чел.
CHO, трансфицир. CLDN18.1 чел.
CL-1xI2C-scFc
Контроль: конструкция на основе антитела к EGFRvIII xI2C-scFc
Положительный контроль (экспрессия мишени)

Фигура 7

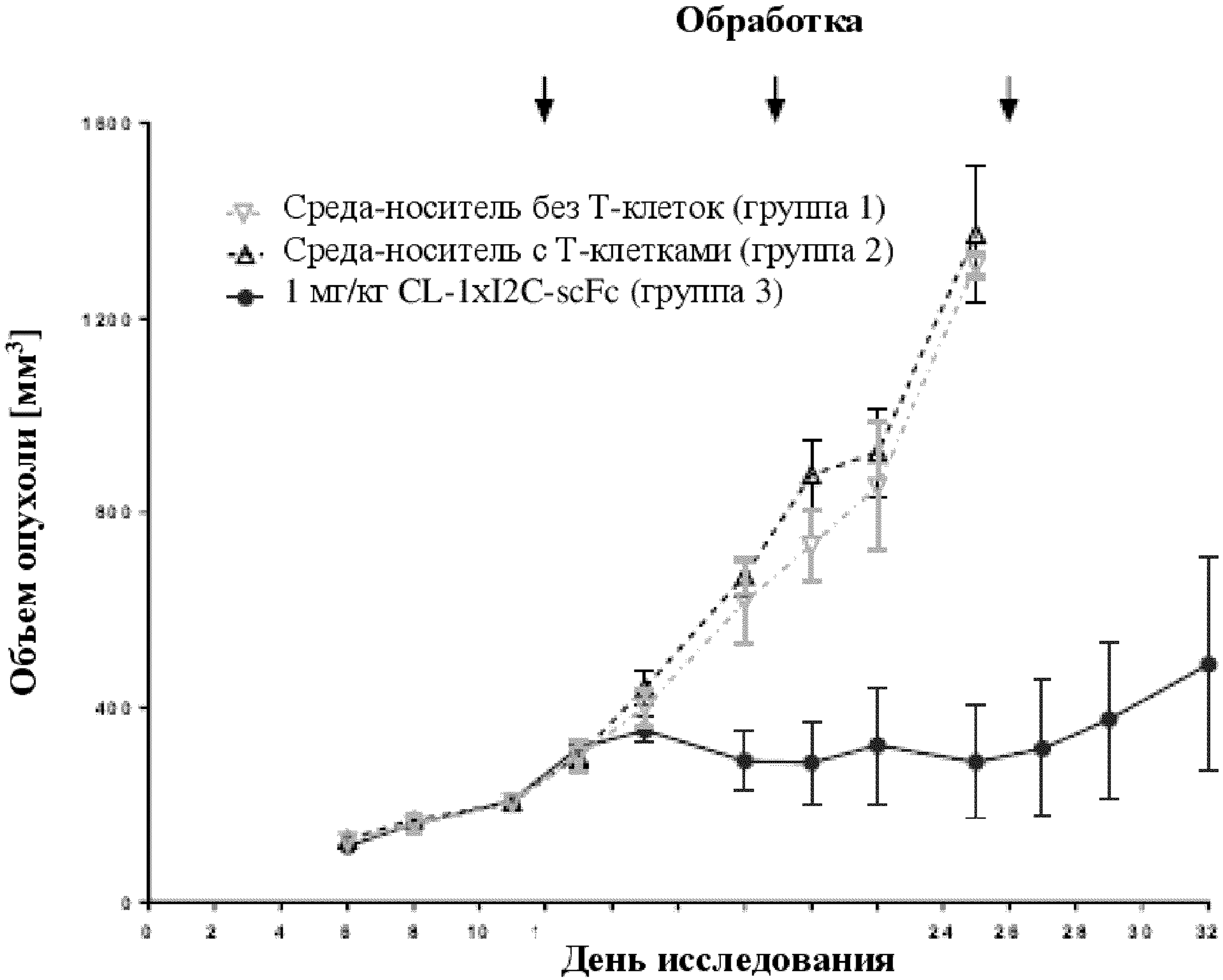

GSU
CL-1xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Отр. контр. xI2C-scFc
CL-1xI2C-scFc
CL-3xI2C-scFc
CL-4xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Лизис [%]
log [конструкция на основе антитела], пМ
IM95
CL-1xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Отр. контр. xI2C-scFc
CL-1xI2C-scFc
CL-3xI2C-scFc
CL-4xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Лизис [%]
log [конструкция на основе антитела], пМ
NUGC4
CL-1xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Отр. конт. xI2C-scFc
CL-1xI2C-scFc
CL-3xI2C-scFc
CL-4xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Лизис [%]
log [конструкция на основе антитела], пМ
CHO-CLDN18.2
CL-1xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Отр. контр. xI2C-scFc
CL-1xI2C-scFc
CL-3xI2C-scFc
CL-4xI2C-scFc
CL-2xI2C-scFc
Лизис [%]
log [конструкция на основе антитела], пМ

Фигура 7 (продолжение)



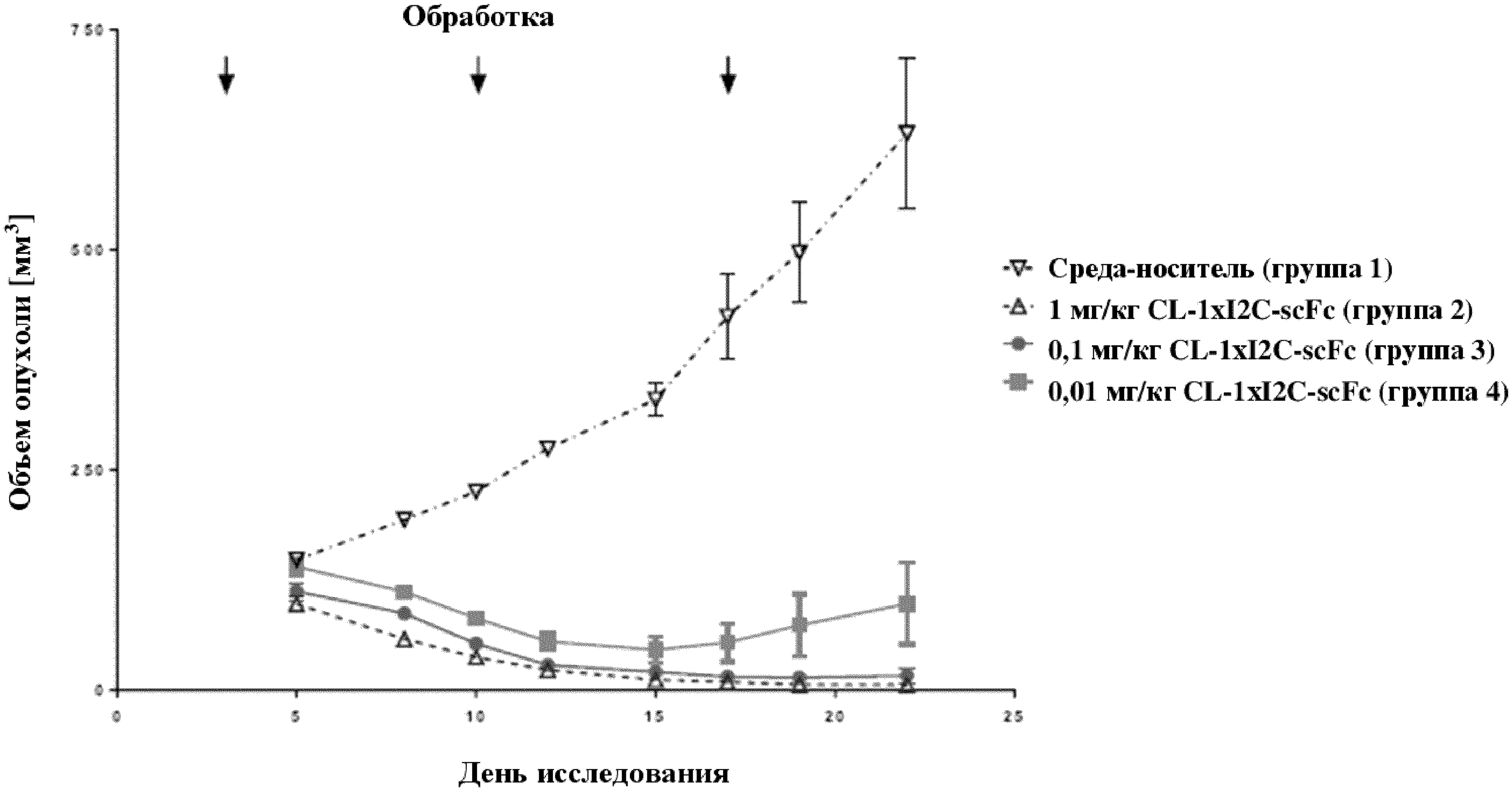


Фигура 8



Обработка
Среда-носитель без Т-клеток (группа 1)
Среда-носитель с Т-клетками (группа 2)
1 мг/кг CL-1xI2C-scFc (группа 3)
Объем опухоли [мм³]
День исследования

Фигура 9


Обработка
750
500
250
0
0
5
10
15
20
25
Объем опухоли [мм3]
День исследования
Среда-носитель (группа 1)
1 мг/кг CL-1xI2C-scFc (группа 2)
0,1 мг/кг CL-1xI2C-scFc (группа 3)
0,01 мг/кг CL-1xI2C-scFc (группа 4)