(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192155 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.15

(22) Дата подачи заявки
2020.02.03

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

(54) АНТИТЕЛА К КЛАУДИНУ 18 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

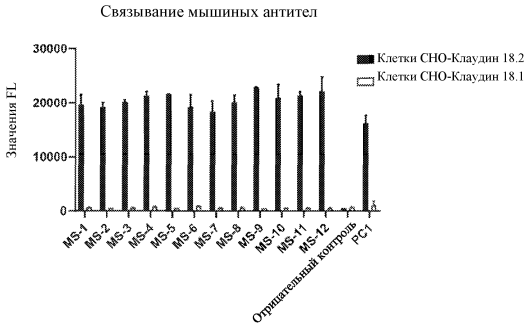
(31) **62/800,359; 62/891,925**
(32) **2019.02.01; 2019.08.26**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/016459**
(87) **WO 2020/160560 2020.08.06**
(88) **2020.09.17**

(71) Заявитель:
НОВАРОК БИОТЕРАПЕУТИКС, ЛТД. (US)

(72) Изобретатель:
Ли Хань, Лэй Мин, Пэй И, Хуан Хайчунь (US)

(74) Представитель:
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М., Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В., Парамонова К.В., Христофоров А.А. (RU)

(57) Раскрыты антитела, которые специфически связываются с человеческой молекулой плотных контактов CLDN18.2 и обладают функциональными свойствами, которые делают их пригодными для применения в основанной на антителах иммунотерапии заболевания, связанного с аберрантной экспрессией CLDN18.2.



202192155 A1

202192155 A1

АНТИТЕЛА К КЛАУДИНУ 18 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/800359, поданной 1 февраля 2019 г., и предварительной заявке на патент США № 62/891925, поданной 26 августа 2019 г. Полное содержание вышеуказанных заявок включены в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к специфическим к клаудину 18.2 (CLDN18.2) антителам и их фрагментам. Антитела полезны для иммунотерапии заболевания, связанного с аберрантной экспрессией CLDN18.2, включая первичный и метастатический рак, происходящий из эпителиальных клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Два альтернативно сплайсированных варианта транскрипта человеческого клаудина 18, кодирующие различные изоформы, которые демонстрируют экспрессию, ограниченную легкими (CLDN18.1) и ограниченную желудком (CLDN18.2) (Niimi et al., Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001) промотор-зависимым образом, были описаны ранее. Первичные белковые последовательности сплайс-вариантов отличаются в N-концевой части, которая содержит N-концевую внутриклеточную область, первую трансмембранную область (TMD1) и первую внеклеточную петлю (ECL1). CLDN18.2 представляет собой один из немногих членов семейства клаудинов человека, строго ограниченный одной клеточной линией дифференцировки (Türeci et al.). Более конкретно, он представляет собой высокоселективный маркер линии дифференцировки в желудке (например, специфический для гастроцитов) с профилем экспрессии, который ограничивается короткоживущими дифференцированными эпителиальными клетками и отсутствует в зоне стволовых клеток желудочных желез (Sahin et al., Clin. Cancer Res. 14 (23) 7624-7634, 2008).

[0004] CLDN18.2 сохраняется при злокачественной трансформации и экспрессируется в значительной части первичных опухолей и их метастазах. Sahin et al. также сообщили, что CLDN18.2, но не CLDN18.1, часто сверхэкспрессируется в нескольких различных типах злокачественных новообразований, включая злокачественные новообразования поджелудочной железы, желудка, пищевода, легких и яичников. Таким образом, в контексте рака CLDN18.2 не ограничивается линией дифференцировки клеток в желудке (Sahin et al.). Рассмотренные вместе, результаты опубликованных отчетов демонстрируют, что CLDN18.2 представляет собой как диагностический инструмент, так и лекарственную мишень для разработки видов противораковой иммунотерапии для заболеваний, связанных с опухолями, происходящими из эпителиальных клеток.

[0005] Сообщалось, что проницаемость плотных контактов в опухолевых тканях часто выше, чем в нормальных тканях, что позволяет предположить, что белки клаудина на опухолевых клетках могут быть более доступны, чем в нормальных тканях с интактными плотными тканями. Эта возможность делает белки клаудина привлекательными мишенями для терапевтического лечения рака. Кроме того, опубликованные результаты профилирования экспрессии предполагают, что виды противораковой терапии, нацеленной на CLDN18.2, будут иметь благоприятные профили системной токсичности, поскольку нормальные процессы регенерации и гомеостаза восстанавливают эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта каждые два-семь дней (Sahin *et al.*). Преходящая желудочно-кишечная токсичность ограниченной продолжительности является распространенным и устранимым нежелательным явлением при применении противораковых иммунотерапевтических средств.

[0006] Рак поджелудочной железы и гастроэзофагеальный рак относятся к злокачественным новообразованиям с наибольшими неудовлетворенными медицинскими потребностями (Sahin, et al.). Несмотря на то, что рак желудка и рак поджелудочной железы способствуют значительной заболеваемости и смертности, связанной с раком, возможности лечения ограничены. Таким образом, существует потребность в специфических антителах к CLDN18.2 и связывающих агентах для применения в иммунотерапии рака, связанного с первичными и метастатическими солидными опухолями, происходящими из эпителиальных клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение решает вышеуказанную задачу, обеспечивая антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с молекулой плотного контакта изоформой 2 CLDN18 человека (CLDN18.2) и обладают желательными функциональными свойствами. Антитела к CLDN18.2 или их фрагменты, или биспецифические молекулы, или слитые белки, содержащие антитела к CLDN18.2 или фрагменты антител, могут быть использованы для основанных на антителах видах терапии заболеваний, связанных с дисрегуляцией экспрессии CLDN18.2. Например, антитела можно использовать для лечения онкологических заболеваний в виде солидных опухолей, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, таких как рак желудка, поджелудочной железы и пищевода, легкого, яичников, толстой кишки и печени.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению может быть моноклональным, химерным, гуманизированным или человеческим антителом, компонентом биспецифического или полиспецифического антитела или антигенсвязывающей частью антитела, которое связывается с первым внеклеточным доменом/петлей CLDN18.2 и проявляет одно или более из следующих свойств: (a) специфичность в отношении CLDN18.2 (например. связывание с CLDN18.2 человека, но не с CLDN18.1); (b) способность опосредовать уничтожение клеток, экспрессирующих CLDN18.2, путем АЗКЦ; и (c) эффективно интернализуются при связывании CLDN18.2 с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, и поэтому подходят для разработки КАЛС.

[0009] В некоторых вариантах осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их фрагменты связываются преимущественно с CLDN18.2 (изоформа 2), естественно экспрессируемым опухолевыми клетками человека, и не связываются с изоформой 1 CLDN18 (CLDN18.1).Вследствие связывания CLDN18.2, экспрессируемого на поверхности клетки-мишени, описанные антитела могут опосредовать уничтожение клетки-мишени одним или более механизмами действия, такими как индукция апоптоза, ингибирование пролиферации, лизис путем КЗЦ, лизис путем АЗКЦ или доставка цитотоксического агента. В одном варианте осуществления клетки-мишени представляют собой клетки первичного или метастатического рака.

[0010] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой полноразмерное антитело.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой фрагмент антитела. В дополнительных вариантах осуществления фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из: фрагмента Fab, Fab', F(ab)2, Fd, Fv, scFv и scFv-Fc, одноцепочечного антитела, миниантитела и диатела.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой моноклональное антитело.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой мышиное антитело.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой человеческое

антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой гуманизированное антитело.

[0015] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой химерное антитело.

[0016] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 представляет собой биспецифическое антитело, содержащее или немодифицированный (например, встречающийся в природе) фрагмент Fc, или модифицированный фрагмент Fc, разработанный для оптимизации или, в альтернативном варианте, для устранения определенных Fc-опосредованных функций.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 47 (HCDR1), SEQ ID NO: 48 (HCDR2), и SEQ ID NO: 49 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 50 (LCDR1), SEQ ID NO: 51 (LCDR2), и SEQ ID NO: 52 (LCDR3).

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 53 (HCDR1), SEQ ID NO: 54 (HCDR2), и SEQ ID NO: 55 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 56 (LCDR1), SEQ ID NO: 57 (LCDR2), и SEQ ID NO: 58 (LCDR3).

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 59 (HCDR1), SEQ ID NO: 60 (HCDR2), и SEQ ID NO: 61 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 62 (LCDR1), SEQ ID NO: 63 (LCDR2), и SEQ ID NO: 64 (LCDR3).

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 65 (HCDR1), SEQ ID NO: 66 (HCDR2), и SEQ ID NO: 67 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 68 (LCDR1), SEQ ID NO: 69 (LCDR2), и SEQ ID NO: 70 (LCDR3).

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 71 (HCDR1), SEQ ID NO: 72 (HCDR2), и SEQ ID NO: 73 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 74 (LCDR1), SEQ ID NO: 75 (LCDR2), и SEQ ID NO: 76 (LCDR3).

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 77 (HCDR1), SEQ ID NO: 78 (HCDR2), и SEQ ID NO: 79 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 80 (LCDR1), SEQ ID NO: 81 (LCDR2), и SEQ ID NO: 82 (LCDR3).

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 83 (HCDR1), SEQ ID NO: 84 (HCDR2), и SEQ ID NO: 85 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 86 (LCDR1), SEQ ID NO: 87 (LCDR2), и SEQ ID NO: 88 (LCDR3).

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 89 (HCDR1), SEQ ID NO: 90 (HCDR2), и SEQ ID NO: 91 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 92 (LCDR1), SEQ ID NO: 93 (LCDR2), и SEQ ID NO: 94 (LCDR3).

[0025] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 95 (HCDR1), SEQ ID NO: 96 (HCDR2), и SEQ ID

NO: 97 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 98 (LCDR1), SEQ ID NO: 99 (LCDR2), и SEQ ID NO: 100 (LCDR3).

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 101 (HCDR1), SEQ ID NO: 102 (HCDR2), и SEQ ID NO: 103 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 104 (LCDR1), SEQ ID NO: 105 (LCDR2), и SEQ ID NO: 106 (LCDR3).

[0027] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 107 (HCDR1), SEQ ID NO: 108 (HCDR2), и SEQ ID NO: 109 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 110 (LCDR1), SEQ ID NO: 111 (LCDR2), и SEQ ID NO: 112 (LCDR3).

[0028] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 113 (HCDR1), SEQ ID NO: 114 (HCDR2), и SEQ ID NO: 115 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 116 (LCDR1), SEQ ID NO: 117 (LCDR2), и SEQ ID NO: 118 (LCDR3).

[0029] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 119 (HCDR1), SEQ ID NO: 120 (HCDR2), и SEQ ID NO: 121 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 122 (LCDR1), SEQ ID NO: 123 (LCDR2), и SEQ ID NO: 124 (LCDR3).

[0030] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 125 (HCDR1), SEQ ID NO: 126 (HCDR2), и SEQ ID NO: 127 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 128 (LCDR1), SEQ ID NO: 129 (LCDR2), и SEQ ID NO: 130 (LCDR3).

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 131 (HCDR1), SEQ ID NO: 132 (HCDR2), и SEQ ID NO: 133 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 134 (LCDR1), SEQ ID NO: 135 (LCDR2), и SEQ ID NO: 136 (LCDR3).

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 137 (HCDR1), SEQ ID NO: 138 (HCDR2), и SEQ ID NO: 139 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 140 (LCDR1), SEQ ID NO: 141 (LCDR2), и SEQ ID NO: 142 (LCDR3).

[0033] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 143 (HCDR1), SEQ ID NO: 144 (HCDR2), и SEQ ID NO: 145 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 146 (LCDR1), SEQ ID NO: 147 (LCDR2), и SEQ ID NO: 148 (LCDR3).

[0034] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 149 (HCDR1), SEQ ID NO: 150 (HCDR2), и SEQ ID NO: 151 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 152 (LCDR1), SEQ ID NO: 153 (LCDR2), и SEQ ID NO: 154 (LCDR3).

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 155 (HCDR1), SEQ ID NO: 156 (HCDR2), и SEQ ID NO: 157 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 158 (LCDR1), SEQ ID

NO: 159 (LCDR2), и SEQ ID NO: 160 (LCDR3).

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 161 (HCDR1), SEQ ID NO: 162 (HCDR2), и SEQ ID NO: 163 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 164 (LCDR1), SEQ ID NO: 165 (LCDR2), и SEQ ID NO: 166 (LCDR3).

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 167 (HCDR1), SEQ ID NO: 168 (HCDR2), и SEQ ID NO: 169 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 170 (LCDR1), SEQ ID NO: 171 (LCDR2), и SEQ ID NO: 172 (LCDR3).

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 173 (HCDR1), SEQ ID NO: 174 (HCDR2), и SEQ ID NO: 175 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 176 (LCDR1), SEQ ID NO: 177 (LCDR2), и SEQ ID NO: 178 (LCDR3).

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 179 (HCDR1), SEQ ID NO: 180 (HCDR2), и SEQ ID NO: 181 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 182 (LCDR1), SEQ ID NO: 183 (LCDR2), и SEQ ID NO: 184 (LCDR3).

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 221 (HCDR1), SEQ ID NO: 222 (HCDR2), и SEQ ID NO: 223 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 224 (LCDR1), SEQ ID NO: 225 (LCDR2), и SEQ ID NO: 226 (LCDR3).

[0041] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 227 (HCDR1), SEQ ID NO: 228 (HCDR2), и SEQ ID NO: 229 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 230 (LCDR1), SEQ ID NO: 231 (LCDR2), и SEQ ID NO: 232 (LCDR3).

[0042] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 233 (HCDR1), SEQ ID NO: 234 (HCDR2), и SEQ ID NO: 235 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 236 (LCDR1), SEQ ID NO: 237 (LCDR2), и SEQ ID NO: 238 (LCDR3).

[0043] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 239 (HCDR1), SEQ ID NO: 240 (HCDR2), и SEQ ID NO: 241 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 242 (LCDR1), SEQ ID NO: 243 (LCDR2), и SEQ ID NO: 244 (LCDR3).

[0044] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 245 (HCDR1), SEQ ID NO: 246 (HCDR2), и SEQ ID NO: 247 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 248 (LCDR1), SEQ ID NO: 249 (LCDR2), и SEQ ID NO: 250 (LCDR3).

[0045] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 251 (HCDR1), SEQ ID NO: 252 (HCDR2), и SEQ ID NO: 253 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 254 (LCDR1), SEQ ID NO: 255 (LCDR2), и SEQ ID NO: 256 (LCDR3).

[0046] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 257 (HCDR1), SEQ ID NO: 258 (HCDR2), и SEQ ID NO: 259 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 260 (LCDR1), SEQ ID NO: 261 (LCDR2), и SEQ ID NO: 262 (LCDR3).

[0047] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 263 (HCDR1), SEQ ID NO: 264 (HCDR2), и SEQ ID NO: 265 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 266 (LCDR1), SEQ ID NO: 267 (LCDR2), и SEQ ID NO: 268 (LCDR3).

[0048] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 269 (HCDR1), SEQ ID NO: 270 (HCDR2), и SEQ ID NO: 271 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 272 (LCDR1), SEQ ID NO: 273 (LCDR2), и SEQ ID NO: 274 (LCDR3).

[0049] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 275 (HCDR1), SEQ ID NO: 276 (HCDR2), и SEQ ID NO: 277 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 278 (LCDR1), SEQ ID NO: 279 (LCDR2), и SEQ ID NO: 280 (LCDR3).

[0050] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 281 (HCDR1), SEQ ID NO: 282 (HCDR2), и SEQ ID NO: 283 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 284 (LCDR1), SEQ ID NO: 285 (LCDR2), и SEQ ID NO: 286 (LCDR3).

[0051] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 287 (HCDR1), SEQ ID NO: 288 (HCDR2), и SEQ ID NO: 289 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 290 (LCDR1), SEQ ID NO: 291 (LCDR2), и SEQ ID NO: 292 (LCDR3).

[0052] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 293 (HCDR1), SEQ ID NO: 294 (HCDR2), и SEQ ID NO: 295 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 296 (LCDR1), SEQ ID NO: 297 (LCDR2), и SEQ ID NO: 298 (LCDR3).

[0053] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 299 (HCDR1), SEQ ID NO: 300 (HCDR2), и SEQ ID NO: 301 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 302 (LCDR1), SEQ ID NO: 303 (LCDR2), и SEQ ID NO: 304 (LCDR3).

[0054] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 311 (HCDR1), SEQ ID NO: 312 (HCDR2), и SEQ ID NO: 313 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 314 (LCDR1), SEQ ID NO: 315 (LCDR2), и SEQ ID NO: 316 (LCDR3).

[0055] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 317 (HCDR1), SEQ ID NO: 318 (HCDR2), и SEQ ID NO: 319 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 320 (LCDR1), SEQ ID NO: 321 (LCDR2), и SEQ ID NO: 322 (LCDR3).

[0056] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 323 (HCDR1), SEQ ID NO: 324 (HCDR2), и SEQ ID NO: 325 (HCDR3); и/или вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 326 (LCDR1), SEQ ID NO: 327 (LCDR2), и SEQ ID NO: 328 (LCDR3).

[0057] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 215, 217, и 219.

[0058] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218, и 220.

[0059] В настоящем изобретении дополнительно представлены специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты, включающие антитело или связывающий CLDN18.2 фрагмент, содержащий специфическую комбинацию или пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи.

[0060] В одном из вариантов осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты включают антитело или его связывающий CLDN18.2 фрагмент, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 и 45, соответственно, в паре с последовательностью вариабельной областью легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46, соответственно.

[0061] В одном из вариантов осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты включают антитело или его связывающий CLDN18.2 фрагмент, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 215, 217 и 219, соответственно, в паре с последовательностью вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218 и 220, соответственно.

[0062] В одном из вариантов осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты включают антитело или связывающий CLDN18.2 фрагмент, содержащее специфическую комбинацию или пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепей. В альтернативном варианте осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты включают антитело, или CLDN18.2-связывающий фрагмент или связывающий агент, содержащее определенные наборы или комбинации последовательностей CDR, полученных из доменов VH и/или VL антител к CLDN18.2 по изобретению.

[0063] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит специфическую пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:1, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:2;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:4;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:5, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:6;

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:8;

(e) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:9, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:10;

(f) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:12;

(g) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:13, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:14;

(h) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:15, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:16;

(i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:17, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:18;

(j) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:19, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:20;

(k) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:21, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:22;

(l) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:23, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:24;

(m) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:25, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:26;

(n) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:27, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:28;

(o) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:30;

(p) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:32;

(q) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:33, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:34;

(r) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:35, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:36;

(s) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:37, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:38;

(t) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:40;

(u) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:41, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:42;

(v) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:43, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:44; и

(w) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:45, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:46.

[0064] В некоторых вариантах осуществления предложенные антитела представляют собой полностью человеческие антитела к CLDN18.2 или их антигенсвязывающий фрагмент, содержащие специфическую пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций:

(aa) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:185, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:186;

(bb) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:187, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:188;

(cc) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:189, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:190;

(dd) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:191, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:192;

(ee) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:193, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:194;

(ff) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:195, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:196;

(gg) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:197, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:198;

(hh) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:199, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:200;

(ii) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:201, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:202;

(jj) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:203, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:204;

(kk) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:205, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:206;

(ll) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:207, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:208;

(mm) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:209, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:210;

(nn) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:211, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:212;

(oo) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:215, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:216;

(pp) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:217, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:218; и

(qq) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:220.

[0065] Специалист также понимает, что вариабельные области легких цепей и вариабельные области тяжелых цепей могут быть независимо выбраны или смешаны и подобраны из антител, представленных в данном документе.

[0066] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат

комбинацию последовательностей CDR, полученных из последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 и 45, и последовательности вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 и 46.

[0067] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат комбинацию последовательностей CDR, полученных из последовательности вариабельной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 215, 217 и 219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218 и 220.

[0068] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18 и их фрагменты содержат одну или более CDR вариабельной области тяжелой цепи, описанных в таблице 1, и/или одну или более CDR вариабельной области легкой цепи, описанных в таблице 3.

[0069] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18 и их фрагменты содержат одну или более CDR вариабельной области тяжелой цепи, описанных в таблице 2, и/или одну или более CDR вариабельной области легкой цепи, описанных в таблице 4.

[0070] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 или фрагмент антитела представляет собой рекомбинантное антитело (например, химерное антитело, гуманизированное антитело или биспецифическое антитело), содержащее шесть (6) CDR, все из которых получены из домена VH или VL одного антитела к CLDN18.2, описанного в данном документе. Например, связывающий агент может содержать все шесть областей CDR для антитела к CLDN18.2, обозначенного как Hu-1. В этом случае антитело или связывающий агент будет содержать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 221-223 и SEQ ID NO: 224-226, представляющие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных доменов тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных доменов легкой цепи, соответственно, антитела Hu-1.

[0071] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN18 или их фрагменты связываются с первым внеклеточным доменом/петлей CLDN18.2 и проявляют одно или более из следующих свойств: связываются преимущественно с изоформой 2 CLDN18, естественно экспрессируемой опухолевыми клетками человека, не связываются с изоформой 1 CLDN18 (CLDN18.1), эффективно интернализуются с поверхностью CLDN18.2-положительных клеток после связывания, способны направлять уничтожение CLDN18.2-положительных клеток, индуцируя лизис, опосредованный антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антителозависимый фагоцитоз (АЗКФ).

[0072] В настоящем изобретении также представлены способы лечения первичного и метастатического рака, происходящего из эпителиальных клеток, включающие введение композиции или состава, содержащего антитело к CLDN18.2, биспецифическое антитело, содержащее анти-CLDN18.2-специфический связывающий агент, или фрагмент антитела, и, необязательно, другую иммунотерапию нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из солидной опухоли, рака желудка, рака пищевода, рака пищеводно-желудочного перехода, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака легкого, рака яичников, рака толстой кишки, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря. В некоторых случаях другая иммунотерапия представляет собой ингибитор контрольной точки.

[0073] Антитела к CLDN18.2 по изобретению также могут быть использованы для разработки иммунотерапевтических средств на основе антител, которые основаны на CLDN18.2-специфическом связывании для направления эффекторных клеток пациента (например, Т-клеток или NK-клеток) к опухолям,

включая биспецифические антитела, привлекающие Т-клетки, или биспецифические молекулы, перенаправляющие NK-клетки, или клеточные терапии, такие как CAR-T-терапия, или для доставки токсичной полезной нагрузки (например, конъюгированного цитотоксического лекарственного средства) к CLDN18.2-положительным солидным опухолям.

[0074] Антитела к CLDN18.2 по данному изобретению также могут применяться для диагностики рака желудка, рака пищевода, рака пищеводно-желудочного перехода, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака легкого, рака яичников, рака толстой кишки, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0075] Предшествующее краткое описание сущности изобретения, а также последующее подробное описание сущности изобретения, будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации изобретения на фигурах приведены варианты осуществления изобретения, которые в настоящее время являются предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено точными приведенными схемами, примерами и инструментами.

[0076] На Фиг. 1 представлены аминокислотные последовательности доменов VH и VL мышиного антитела к CLDN18.2 и соответствующие им последовательности CDR. Идентификаторы последовательностей приведены, а CDR подчеркнуты в последовательностях вариабельных доменов.

[0077] На Фиг. 2 приведены аминокислотные последовательности доменов VH и VL человеческого антитела к CLDN18.2 и соответствующие им последовательности CDR. Идентификаторы последовательностей приведены, а CDR подчеркнуты в последовательностях вариабельных доменов.

[0078] На Фиг. 3A, 3B и 3C показано связывание мышиных антител к клаудину 18.2 с клетками CHO-Клаудин 18.2. На Фиг. 3A показаны значения интенсивности связывания мышиного антитела к клаудину 18.2. На Фиг. 3B показаны кривые связывания мышиных антител к клаудину 18.2 Ms-1, Ms-2, и Ms-3 с клетками CHO-Клаудин 18.2. На Фиг. 3C показано связывание антител к клаудину 18.2 Ms-4 и Hu-3 с клетками CHO-Клаудин 18.2, но не с CHO-Клаудин 18.1.

[0079] На Фиг. 4A и 4B представлены графики, демонстрирующие связывание человеческого антитела к клаудину 18.2 с клетками CHO-Клаудин18.2 и CHO-Клаудин 18.1. На Фиг. 4A показано связывание человеческих антител к клаудину 18.2. На Фиг. 4B показаны кривые связывания человеческих антител к клаудину 18.2 Hu-2, Hu-9 и Hu-10 с клетками CHO-Клаудин 18.2.

[0080] На Фиг. 5 представлена гистограмма, демонстрирующая сравнение уровня экспрессии поверхностного клаудина 18.2 на CHO-Клаудин 18.2 и линиях опухолевых клеток PATU8988S и NUGC-4.

[0081] На Фиг. 6A и 6B представлены гистограммы, демонстрирующие связывание антител к клаудину 18.2 с линией опухолевых клеток PATU8988S. На Фиг. 6A показаны значения интенсивности связывания мышиных антител к клаудину 18.2. На Фиг. 6B показано связывание человеческих антител к клаудину 18.2.

[0082] На Фиг. 7 представлена гистограмма, демонстрирующая связывание человеческого антитела к клаудину 18.2 с линией опухолевых клеток NUGC-4.

[0083] На Фиг. 8 представлена гистограмма, демонстрирующая связывание человеческого антитела к клаудину 18.2 с линией опухолевых клеток KatoIII.

[0084] На Фиг. 9 продемонстрирована Hu-2-, Hu-7- и Hu-9-опосредованную антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ).

[0085] На Фиг. 10 продемонстрирован антителоопосредованный эндоцитоз, индуцированный антителами к

клаудину 18.2 Hu-2, Hu-7, Hu-9 и Hu-11.

[0086] На Фиг. 11A и 11B представлены аминокислотные последовательности четырех доменов CH человеческого иммуноглобулина IgG1 (Фиг. 11A) и домен Cl легкой каппа-цепи (Фиг. 11B), подходящие для применения в комбинации с описанными доменами VH и VL и/или последовательностями CDR анти-CLDN18.2. Представлены идентификаторы последовательностей.

[0087] На Фиг. 12 представлена аминокислотная последовательность двух рекомбинантных тяжелых цепей репрезентативных полноразмерных антител к CLDN18.2, включающих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 336 или SEQ ID NO: 338, любая из которых может быть соединена с рекомбинантной легкой каппа-цепью, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 337, для получения полноразмерного человеческого антитела IgG1 к CLDN18.2.

[0088] На Фиг. 13A и 13B показано, что Fc-модифицированные антитела к клаудину 18.2 NBL-014P и NBL-014G индуцируют усиленную АЗКЦ против клеток CHO, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2 человека, с использованием суррогатных эффекторных клеток Promega (Фиг. 13A) или клеток NK92MI, сверхэкспрессирующих CD16A (Фиг. 13B).

[0089] На Фиг. 14A и 14B показано, что Fc-модифицированные антитела к клаудину 18.2 NBL-014P и NBL-014G индуцируют усиление АЗКЦ против клеток NUGC-4 (Фиг. 14A) и клетки PATU8988S (Фиг. 14B).

[0090] На Фиг. 15 показано, что Fc-модифицированные антитела к клаудину 18.2 NBL-014P и NBL-014G индуцируют усиленную КЗЦ против клеток CHO, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2 человека по сравнению с активностью КЗЦ PC1.

[0091] На Фиг. 16 показано, что Fc-модифицированные антитела к клаудину 18.2 NBL-014P и NBL-014G индуцируют повышенную активность КЗЦ против клеток PATU8988S по сравнению с активностью КЗЦ PC1.

[0092] На Фиг. 17A-17B показана активность АЗКФ антител к клаудину18.2 против клеток CHO, сверхэкспрессирующих человеческий клаудин 18.2 (Фиг. 17A), и клеток NUGC-4 (Фиг. 17B).

[0093] На Фиг. 18A и 18B показана противоопухолевая эффективность антител к клаудину 18.2 NBL-014 и PC1 в подкожной модели PATU8988S, сверхэкспрессирующей клаудин 18.2 человека, на основании определения изменений объема опухоли в зависимости от времени (Фиг. 18A) и массы опухоли на 34-й день (Фиг. 18B).

[0094] На Фиг. 19 представлен график, демонстрирующий противоопухолевую эффективность антител к клаудину 18.2 NBL-014 и PC1 в подкожной модели NUGC-4 на основании изменений объема опухоли в зависимости от времени.

[0095] На Фиг. 20A и 20B показана противоопухолевая эффективность антитела к клаудину 18.2 NBL-014P в подкожной модели NUGC-4, имплантированной в мышам NOGdKO с приживленными МКПК человека, на основании определения изменений объема опухоли в зависимости от времени (Фиг. 20A) и массы опухоли на 28-й день (Фиг. 20B).

[0096] На Фиг. 21 представлена аминокислотная последовательность изоформы 2 клаудина 18 человека (клаудин 18.2) (SEQ ID NO: 329) и изоформы 1 клаудина 18 человека (клаудин 18.1) (SEQ ID NO: 330).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0097] Настоящее изобретение в целом относится к специфическим к клаудину 18.2 (CLDN18.2) антителам и их фрагментам. Антитела к CLDN18.2 или их фрагменты, или биспецифические молекулы, или слитые белки, содержащие CDR или последовательности VH и VL описанных антител к CLDN18.2, могут быть использованы для основанной на антителах терапии заболеваний, связанных с дисрегуляцией экспрессии

CLDN18.2. Более конкретно, антитела к CLDN18.2 могут быть использованы для иммунотерапии первичного и метастатического рака, происходящего из эпителиальных клеток, включая рак желудка, поджелудочной железы и пищевода, легкого, яичников, толстой кишки и печени.

[0098] Для лучшего понимания изобретения ниже приведены конкретные определения некоторых технических и научных терминов. Если в данном документе нет специальных определений, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, как правило, понимаемое человеком с обычными навыками в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[0099] В данном изобретении будут использоваться следующие сокращения.

КАЛС – конъюгат антитело-лекарственное средство.

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность.

КЗЦ – комплементзависимая цитотоксичность.

CDR – определяющая комплементарность область в вариабельных областях иммуноглобулинов.

ВКД – внеклеточный домен.

FR - каркасная область антитела, вариабельные области иммуноглобулина, исключая области CDR.

EC50 – концентрация антитела, которая дает полумаксимальное связывание, или эффективная концентрация антитела, которая дает 50% от максимального ответа.

IC50 – концентрация, приводящая к 50% ингибированию.

МкАт или мАт или мкАт – моноклональное антитело.

VH или V_H – вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина.

VL или V_L – вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина.

уАЗКЦ – усиленная антителозависимая клеточная цитотоксичность.

АЗКФ – антителозависимый клеточный фагоцитоз.

Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина.

FcRn - неонатальный Fc-рецептор.

[0100] Как используется в данном документе, термин «CLDN» означает клаудин и включает CLDN18.2 и CLDN 18.1. Предпочтительно, клаудин представляет собой клаудин человека.

[0101] В контексте данного документа термин «изоформа 2 клаудина 18» (используется взаимозаменяемо с CLDN18.2) относится к пептиду, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности, представленной в записи Uni-Prot P56856 (CLD18_human), идентифицированной как P56856-2, изоформа (сплайс-вариант 2), включая посттрансляционно модифицированные варианты и видовые гомологи, присутствующие на поверхности нормальных или трансформированных раковых клеток или экспрессируемые на клетках, трансфицированных геном CLDN18.2. Клаудин 18.2 предпочтительно имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 329.

[0102] В контексте данного документа термин «изоформа 1 клаудина 18» (используется взаимозаменяемо с CLDN18.1) относится к пептиду, содержащему или состоящему из аминокислотной последовательности, представленной в записи Uni-Prot P56856 (CLD18_human), идентифицированной как P56856-1 изоформа (сплайс-вариант 1), включая посттрансляционно модифицированные варианты и видовые гомологи, присутствующие на поверхности нормальных или трансформированных раковых клеток или экспрессируемые на клетках, трансфицированных геном CLDN18.1. Клаудин 18.1 предпочтительно имеет аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 330.

[0103] В контексте данного документа термин «внеклеточный домен» или «внеклеточная часть» относится к части молекулы, такой как белок, которая обращена во внеклеточное пространство клетки и предпочтительно доступна снаружи этой клетки, например, с помощью антигенсвязывающих молекул, таких как антитела, расположенных вне клетки. Предпочтительно, термин относится к одной или более внеклеточным петлям или доменам или их фрагменту.

[0104] В контексте данного документа термин «CLDN18-ассоциированное заболевание или расстройство» включает патологическое состояние и/или симптомы, связанные с патологическим состоянием, при которых обнаружены измененные уровни или активность, или доступность CLDN18.2. Иллюстративные CLDN18.2-ассоциированные заболевания или расстройства включают, но не ограничиваются ими, онкологические заболевания, связанные с эпителиальными опухолями, экспрессирующими CLDN18.2, такие как рак поджелудочной железы и гастроэзофагеальный рак.

[0105] Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и включает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела).

[0106] Иллюстративное антитело, такое как IgG, состоит из двух тяжелых и двух легких цепей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (в данном документе сокращенно называемой VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (в данном документе сокращенно называемой VL) и константной области легкой цепи. Области VH и VL могут быть дополнительно поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0107] «Класс» или «изотип» антитела относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно.

[0108] В контексте данного документа термин «IgG» относится к изотипу иммуноглобулина человека, включающему антитела, принадлежащие к четырем подклассам IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0109] Гипервариабельная область, как правило, включает аминокислотные остатки из числа около аминокислотных остатков 24–34 (LCDR1; «L» обозначает легкую цепь), 50–56 (LCDR2) и 89–97 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и около 31–35 (HCDR1; «H» обозначает тяжелую цепь), 50–65 (HCDR2) и 95–102 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), и/или остатки, образующие гипервариабельную петлю (например. остатки 26–32 (LCDR1), 50–52 (LCDR2) и 91–96 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и 26–32 (HCDR1), 53–55 (HCDR2) и 96–101 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917.

[0110] Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связывают один эпитоп за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих мутации природного происхождения или возникших во время

получения препарата моноклональных антител, при этом такие варианты в общем случае присутствуют в незначительном количестве. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, определение «моноклональный» указывает на характеристику антитела, полученного по существу из однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как необходимость получения антитела каким-либо способом. Например, моноклональные антитела для использования согласно настоящему изобретению можно получить с помощью различных способов, включая, без ограничений, метод гибридомы, методы рекомбинантных ДНК, методы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, полностью или частично содержащих локусы человеческого иммуноглобулина, причем такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в данном документе.

[0111] Термин «химерное» антитело относится к рекомбинантному антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из конкретного источника или вида, в то время как остаток тяжелой и/или легкой цепи получен из другого источника или вида.

[0112] «Антитело человека» представляет собой антитело, имеющее аминокислотной последовательностью, соответствующей последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или полученное с использованием любой из методик получения человеческих антител, известных специалисту в данной области техники. Это определение антитела человека конкретно исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки. Антитела человека могут быть получены с помощью различных способов, известных в данной области техники, включая способы, описанные в Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al, *J. Immunol*, 147(I):86-95 (1991). См, также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы отключены, например, иммунизированным мышам HuMab (см., например, Nils Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187 относительно мышей HuMan), ксеномышь (см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584 относительно технологии XENOMOUSE™) или мышь Trianni (см., например, WO 2013/063391, WO 2017/035252 и WO 2017/136734 относительно мыши Trianni).

[0113] Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, которое было сконструировано таким образом, чтобы содержать одну или более человеческих каркасных областей в вариабельной области вместе с нечеловеческими (например, мышиными, крысиными или хомячьими) определяющими комплементарность областями (CDR) тяжелой и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело включает последовательности, которые полностью являются человеческими, за исключением областей CDR. Гуманизированные антитела, как правило, менее иммуногенны для человека по сравнению с негуманизированными антителами и, таким образом, в определенных ситуациях обеспечивают терапевтические преимущества. Специалистам в данной области техники известны гуманизированные антитела, а также подходящие методы их получения. См., например, Hwang, W. Y. K., et al., *Methods* 36:35, 2005; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033, 1989; Jones et al., *Nature*, 321:522-25, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-27, 1988; Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-36, 1988; Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-37, 1989; патенты США №№ 5225539; 5530101; 5585089; 5693761; 5693762; 6180370;

и Selick et al., WO 90/07861, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0114] Термин «мультиспецифическое антитело» используется в самом широком смысле и конкретно охватывает антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем единица VH-VL обладает полиэпитопной специфичностью (т.е. способна связываться с двумя разными эпитопами на одной биологической молекуле или каждым эпитопом на разных биологических молекулах). Такие полиспецифические антитела включают, но не ограничиваются ими, полноразмерные антитела, антитела, имеющие два или более доменов VL и VH, биспецифические диатела и триатела. Термин «полиэпитопная специфичность» относится к способности специфически связываться с двумя или более различными эпитопами на одной или разных мишенях.

[0115] «Двойная специфичность» или «биспецифичность» относится к способности специфически связываться с двумя разными эпитопами на одной или разных мишенях. Однако, в отличие от биспецифических антител, антитела с двойной специфичностью имеют два антигенсвязывающих плеча, которые идентичны в аминокислотной последовательности и каждое Fab-плечо способно распознавать два антигена. Двойная специфичность позволяет антителам взаимодействовать с высокой аффинностью с двумя разными антигенами как одна молекула Fab или IgG. В соответствии с одним из вариантов осуществления мультиспецифическое антитело в виде IgG1 связывается с каждым эпитопом с аффинностью от 5 мкМ до 0,001 пМ, от 3 мкМ до 0,001 пМ, от 1 мкМ до 0,001 пМ, от 0,5 мкМ до 0,001 пМ или от 0,1 мкМ до 0,001 пМ. Термин «моноспецифический» относится к способности связывать только один эпитоп. Мультиспецифические антитела могут иметь структуры, подобные полноценным молекулам иммуноглобулинов, и включать области Fc, к примеру области Fc IgG. Такие структуры могут включать, но не ограничиваются, IgG-Fv, IgG-(scFv)2, DVD-Ig, (scFv)2-(scFv)2-Fc и (scFv)2-Fc-(scFv)2. В случае IgG-(scFv)2 scFv может быть присоединен либо к N-концу, либо к C-концу тяжелой цепи или легкой цепи.

[0116] В контексте данного документа термин «биспецифические антитела» относится к моноклональным, часто человеческим или гуманизированным антителам, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными антигенами. В изобретении одна из специфичностей связывания может быть направлена на CLDN18.2, другая – на любой другой антиген, например, на белок клеточной поверхности, рецептор, субъединицу рецептора, тканеспецифический антиген, белок вирусного происхождения, кодируемый вирусом белок оболочки, белок бактериального происхождения или белок бактериальной поверхности и т.д.

[0117] В контексте данного документа термин «диатела» относится к бивалентным антителам, состоящим из двух полипептидных цепей, в которых каждая полипептидная цепь содержит домены VH и VL, соединенные линкером, который является слишком коротким (например, линкер, состоящий из пяти аминокислот), чтобы позволить внутримолекулярную ассоциацию доменов VH и VL на одной пептидной цепи. Такая конфигурация заставляет каждый домен соединяться с комплементарным доменом на другой полипептидной цепи так, чтобы образовать гомодимерную структуру. Соответственно, термин «триатела» относится к трехвалентным антителам, состоящим из трех пептидных цепей, каждая из которых содержит один домен VH и один домен VL, соединенные линкером, который является чрезвычайно коротким (например, линкер, состоящий из 1–2 аминокислот), чтобы обеспечить внутримолекулярную ассоциацию доменов VH и VL в пределах одной пептидной цепи.

[0118] Термин «фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело.

Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab)_2$; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv). При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые фрагментами «Fab», и остаточный фрагмент «Fc», название которого отражает его способность к легкой кристаллизации. Фрагмент Fab состоит из целой легкой (L) цепи (VL) вместе с доменом вариабельного области тяжелой (H) цепи (VH) и первым константным доменом из одной тяжелой цепи (CH1). Обработка антитела пепсином позволяет выделить одиночный большой фрагмент $F(ab)_2$, который приблизительно соответствует двум фрагментам Fab с бивалентной антигенсвязывающей активностью, соединенным дисульфидной связью, и сохраняющий способность к перекрестному сшиванию антигена. Фрагменты Fab отличаются от фрагментов $F(ab)_2$ тем, что имеют несколько дополнительных остатков на карбоксильном конце домена CH1, включая один или более цистеинов из шарнирного области антитела. В данном документе Fab'-SH представляет собой обозначение Fab', в котором цистеиновый(-е) остаток(-и) константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты $F(ab')_2$ антитела первоначально получали в виде пар фрагментов Fab', которые имеют шарнирные цистеины между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

[0119] Термины «антигенсвязывающий домен» или «антигенсвязывающая часть» антитела (или, проще говоря, «связывающий домен» или «связывающая часть») или аналогичные термины относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываются с антигенным комплексом. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) фрагменты Fab, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) фрагменты F(ab')2, бивалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), которые состоят из домена VH; (vi) выделенные определяющие комплементарность области (CDR), и (vii) комбинации из двух или более выделенных CDR, которые, необязательно, могут быть соединены синтетическим линкером.

[0120] «Fv» состоит из димера одного домена вариабельного области тяжелой цепи и одного домена вариабельной области легкой цепи, жестко связанных посредством нековалентных связей. При фолдинге этих двух доменов наружу выступают шесть гипервариабельных петель (по 3 петли на каждой H- и L-цепи), аминокислотные остатки которых участвуют в связывании антигена и придают антителу специфичность по отношению к связыванию антигена.

[0121] «Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител VH и VL, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, позволяющий sFv образовывать структуру, необходимую для связывания с антигеном. Для обзора sFv см. Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0122] В контексте данного документа термины «определяющая комплементарность область» или «CDR» относятся к коротким полипептидным последовательностям в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи, которые в основном отвечают за опосредование специфического распознавания антигена. В каждой V_L и каждой V_H есть три CDR (называемые CDR1, CDR2 и CDR3).

[0123] Как будет понятно специалистам в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в разных системах нумерации. Однако следует понимать, что раскрытие

последовательности вариабельной тяжелой и/или вариабельной легкой цепи включает раскрытие связанных CDR. Соответственно, раскрытие каждой вариабельной области тяжелой цепи является раскрытием vhCDR (например, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3), а раскрытие каждой вариабельной области легкой цепи является раскрытием vlCDR (например, vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3).

[0124] В определенных вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132- 136 and Lefranc M-P et al, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Если не указано иначе, ссылки на номера остатков в вариабельном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации IMGT.

[0125] В других вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии с MacCallum RM et al, (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745, которая включена в данный документ в полном объеме. См. также, например, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in Antibody Engineering, Kontermann and Diibel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), которая включена в данный документ в полном объеме. В других вариантах осуществления CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая относится к гипервариабельным областям AbM, представляющим собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используется программным обеспечением для моделирования антител AbM компании Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), включенном в данный документ посредством ссылки во всей его полноте.

[0126] «Каркас», или «каркасная область», или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков гипервариабельной области (HVR). FR вариабельного домена обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4.

[0127] «Консенсусная каркасная область человека» представляет собой каркасную область, которая содержит наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе последовательностей каркасной области VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, последовательности VL или VH иммуноглобулина человека выбирают из последовательностей подгруппы вариабельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу по классификации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3. В одном варианте осуществления для VL подгруппа представляет собой подгруппу каппа I согласно Kabat et al., выше. В одном варианте осуществления для VH подгруппа представляет собой подгруппу III согласно Kabat et al. выше.

[0128] «Шарнирная область», как правило, определяется как участок от 216-238 (нумерация EU) или 226-251 (нумерация Kabat) IgG1 человека. Шарнир можно дополнительно разделить на три отдельные области: верхний, средний (например, центральный) и нижний шарнир.

[0129] Термин «область Fc» в данном документе используется для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области и взаимодействует с эндогенными рецепторами, присутствующими на поверхности клеток иммунной системы, и некоторыми белками системы комплемента. Данный термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. В одном варианте осуществления область Fc тяжелой цепи человеческого IgG находится в пределах от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако, область Fc может содержать или не содержать С-концевой лизин (Lys447). Если не указано иное, нумерация

аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

[0130] Термин «выделенное антитело», когда используется для описания различных антител, описанных в данном документе, относится к антителу, которое идентифицировано и отделено и/или выделено из клетки или культуры клеток, в которой оно экспрессировано. Загрязняющие компоненты окружающей природной среды представляют собой вещества, которые как правило могут мешать диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления антитело является очищенным до более чем 95 % или 99 % чистоты, определяемой, например, посредством электрофореза (например, ДСН-ПААГ-электрофореза, изоэлектрического фокусирования (ИЭФ), капиллярного электрофореза) или методом хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Для обзора способов оценки чистоты антител, см., например, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007). В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков на N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающейся чашкой или (2) до гомогенности, полученной методом ДСН-ПААГ электрофореза в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях, используя окрашивание красителем Кумасси синим или, предпочтительно, серебром. Выделенное антитело включает антитела, полученные in situ внутри рекомбинантных клеток, поскольку по меньшей мере один компонент из полипептидного природного окружения будет отсутствовать.

[0131] «Эпитоп» относится к термину из уровня техники, который указывает сайт или сайты взаимодействия между антителом и его антигеном(-ами). Как описано в (Janeway, C, Jr., P. Travers, et al. (2001). Immunobiology: the immune system in health and disease. Part II, Section 3- 8. New York, Garland Publishing, Inc.): «Антитело обычно распознает только небольшую область на поверхности большой молекулы, такой как белок... [Определенные эпитопы], вероятно, состоят из аминокислот из разных частей полипептидной цепи [антигена], которые были собраны вместе в процессе фолдинга белка. Антигенные детерминанты такого рода известны как конформационные или прерывистые эпитопы, поскольку распознаваемая структура состоит из сегментов белка, которые прерывисты в аминокислотной последовательности антигена, но собраны вместе в трехмерной структуре. В отличие от этого, эпитоп, состоящий из одного сегмента полипептидной цепи, называется непрерывным или линейным эпитопом» (Janeway, C., Jr., P. Travers, et al. (2001). Immunobiology: the immune system in health and disease. Part II, Section 3-8. New York, Garland Publishing, Inc.).

[0132] «Антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и эталонное антитело, относится к антителу, которое связывается с перекрывающимся набором аминокислотных остатков антигена по сравнению с эталонным антителом или блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Аминокислотные остатки антитела, которые связываются с антигеном, могут быть определены, например, путем определения кристаллической структуры антитела в комплексе с антигеном или путем осуществления обмена водород/дейтерий. В некоторых вариантах осуществления остатки антитела, которые находятся в пределах 5 Å от антигена, считаются контактирующими с антигеном. В некоторых вариантах осуществления «антитело, которое связывается с тем же эпитопом» в качестве эталонного антитела блокирует связывание эталонного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50 % или более, и, наоборот, эталонное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50 % или более.

[0133] «Блокирующее» антитело или «антагонистическое» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который он связывает. Некоторые блокирующие антитела или антагонистические антитела в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

[0134] В отношении связывания антитела с целевой молекулой термины «специфическое связывание», или «специфически связывается с», или «является специфическим к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретной полипептидной мишени означают связывание, которое измеряемым образом отличается от неспецифического взаимодействия. Например, термины «специфическое связывание», «специфически связывается» и «селективно связывается» относятся к связыванию антитела с эпитопом человеческого CLDN18.2, когда связывание измеримо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание может определяться конкуренцией с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, к примеру, при избытке немеченой мишени. В этом случае связывание считается специфическим, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с» или является «специфическим к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном целевом полипептиде, как используется в данном документе, может быть проиллюстрирован, например, при помощи молекулы, имеющей KD для мишени 10-4 M или ниже, альтернативно 10-5 M или ниже, альтернативно 10-6 M или ниже, альтернативно 10-7 M или ниже, альтернативно 10-8 M или ниже, альтернативно 10-9 M или ниже, альтернативно 10-10 M или ниже, альтернативно 10-11 M или ниже, альтернативно 10-12 M или ниже, или KD в диапазоне от 10-4 M до 10-6 M, или от 10-6 M до 10-10 M, или от 10-7 M до 10-9 M. Как будет понятно специалисту в данной области техники, значения аффинности и KD связаны обратной зависимостью. Высокая аффинность для антигена измеряется низким значением KD. В одном варианте осуществления термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде без значительного связывания с любым другим полипептидом или полипептидным эпитопом.

[0135] В контексте данного документа термин «аффинность» означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела определяется константой диссоциации Kd, определяемой как [Ат]×[Аг]/[Ат-Аг], где [Ат-Аг] – молярная концентрация комплекса антитело-антиген, [Ат] – молярная концентрация несвязанного антитела, а [Аг] – молярная концентрация несвязанного антигена. Константа аффинности Ka определяется 1/Kd. Способы определения аффинности мкАт можно найти в Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), и Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983), ссылки на которые полностью включены в данный документ посредством ссылки. Одним из стандартных способов, хорошо известных в данной области техники, для определения аффинности мкАт является использование скрининга методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, путем анализа с помощью аналитического устройства BIAcore™ SPR).

[0136] «EC50» в отношении агента и конкретной активности (например, связывание с клеткой, ингибирование ферментативной активности, активация или ингибирование иммунной клетки) относится к эффективной концентрации агента, которая производит 50% от его максимального ответа или эффекта в отношении такой активности. «EC100» в отношении агента и конкретной активности означает эффективную концентрацию агента, которая вызывает практически максимальный ответ в отношении такой активности.

[0137] Термин «эффекторные функции» относятся к тем видам биологической активности, присущей области Fc антитела, которые изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии клеточных поверхностных рецепторов (например, B-клеточного рецептора) и B-клеточную активацию.

[0138] В контексте данного документа термин «Fcγ-рецептор» относится к семейству эндогенных рецепторов, расположенных на мембранах иммунных клеток, включая B-лимфоциты, естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки, которые связывают область Fc антител и участвуют в распознавании антигена.

[0139] В контексте данного документа термин «специфически связывается» при ссылке на пару связывания (например. антитело/молекула клеточной поверхности), указывает на реакцию связывания, определяющую присутствие белка, например, CLDN18.2, в гетерогенной популяции белков и/или других биологических веществ. Таким образом, в определенных условиях указанное антитело связывается с конкретным маркером клеточной поверхности и не связывается в значительном количестве с другими белками, присутствующими на поверхности клетки или в образце.

[0140] В контексте данного документа, термин «специфически связывает CLDN18.2» относится к способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента распознавать и связывать эндогенную изоформу 2 клаудина 18, встречающийся на поверхности нормальных или злокачественных клеток, но не изоформу 1 клаудина 18 (CLDN18.1) или любой другой маркер клеточной поверхности, специфичный для конкретной линии.

[0141] В контексте данного документа термин «эндоцитоз» относится к процессу, в ходе которого эукариотические клетки интернализируют сегменты плазматической мембраны, рецепторы клеточной поверхности и компоненты из внеклеточной жидкости. Механизмы эндоцитоза включают рецептор-опосредованный эндоцитоз. Термин «рецептор-опосредованный эндоцитоз» относится к биологическому механизму, с помощью которого лиганд после связывания со своей мишенью вызывает инвагинацию и отщепление мембраны, интернализируется и доставляется в цитозоль или переносится в соответствующие внутриклеточные компартменты.

[0142] В контексте данного документа термины «иммунотерапия на основе антител» и «иммунотерапия» используются для широкого обозначения любой формы терапии, которая основана на целевой специфичности антитела к CLDN18.2, биспецифической молекулы, антигенсвязывающего домена или слитого белка, содержащего антитело к CLDN18.2 или его фрагменты или CDR, для опосредованного прямого или косвенного воздействия на клетку, характеризующуюся аберрантной экспрессией CLDN18.2. Подразумевается, что эти термины охватывают способы лечения с использованием голых антител, биспецифических антител (включая взаимодействие с T-клетками, взаимодействие с NK-клетками и другие форматы взаимодействия с иммунными клетками / эффекторными клетками), конъюгаты антител и лекарственных средств, клеточную терапию с использованием T-клеток (CAR-T) или NK-клеток (CAR-NK), сконструированных так, чтобы они содержали CLDN18.2-специфический химерный антигенный рецептор, и онколитические вирусы, содержащие CLDN18.2-специфический связывающий агент, и генную терапию путем доставки антигенсвязывающих последовательностей антител к CLDN18.2 и экспрессии соответствующих фрагментов антител *in vivo*.

[0143] Также отмечено, что применяемые в данном описании и приложенной формуле изобретения формы единственного числа включают упоминания форм множественного числа, если в контексте явно не указано иное.

Клаудин 18 (CLDN18)

[0144] Белки семейства клаудинов были впервые клонированы и названы в 1998 году как важнейшие структурные и функциональные компоненты плотных контактов. Как семейство, клаудины представляют собой мультигенное семейство тетратрансмембранных белков, участвующих в барьерных функциях эпителиальных и эндотелиальных клеток и поддержании цитоскелета (Furuse et al., J. Cell. Biol. 141(7):1539-50, 1998). CLDN18 имеет различные варианты или конформации, включая изоформу 1 CLDN18 (CLDN18.1) и изоформу 2 CLDN18 (CLDN18.2).

[0145] Первый внеклеточный домен (ВКД) белка клаудина обычно состоит из около 50 аминокислот, в то время как второй домен меньше – около 22 аминокислот (Hashimoto, et al. Drug Discovery Today 21(10):1711-1718, 2016). N-терминальный конец, как правило, очень короткий (например. от четырех до десяти аминокислот), в то время как С-терминальный конец варьирует от 21 до около 63 аминокислот и необходим для локализации белков в плотных контактах.

[0146] Наблюдение того, что проницаемость плотных контактов в опухолевых тканях часто выше, чем в нормальных тканях, привело к предположению, что белки клаудина на опухолевых клетках могут быть более доступны, чем в нормальных тканях с интактными плотными контактами. Это наблюдение также делает белки клаудина привлекательными мишенями для терапевтического вмешательства при раке. Кроме того, опубликованные результаты профилирования экспрессии предполагают, что виды противораковой терапии, нацеленной на CLDN18.2, будут иметь благоприятные профили системной токсичности, поскольку нормальные процессы обновления и гомеостаза восстанавливают эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта каждые два-семь дней (Sahin et al). Преходящая желудочно-кишечная токсичность ограниченной продолжительности является распространенным и устранимым нежелательным явлением при применении противораковых иммунотерапевтических средств.

[0147] CLDN18.2 состоит из четырех трансмембранных доменов с двумя небольшими внеклеточными петлями (петля 1, охваченная гидрофобной областью 1 и гидрофобной областью 2; петля 2, охваченная гидрофобными областями 3 и 4). CLDN18.2 представляет собой трансмембранный белок, поэтому эпитопы, присутствующие в его внеклеточных петлях или образованные ими, представляют собой желательные мишени для противораковой иммунотерапии на основе антител. Однако, учитывая, что CLDN18.1 экспрессируется альвеолярными эпителиальными клетками в нормальной легочной ткани, которая является тканью, имеющей большое значение для токсичности, исключительная специфичность сплайс-варианта была признанной предпосылкой для использования CLDN18.2-специфических антител для противораковой иммунотерапии на основе антител. Sahin et al. первыми сообщили об экспериментальных результатах, подтверждающих, что CLDN18.2 является лекарственной мишенью для противораковой иммунотерапии на основе выделения антител (поликлональных и моноклональных), которые связываются исключительно с CLDN18.2, а не с CLDN18.1 (Sahin et al., Clin. Cancer Res. 14 (23) 7624-7634, 2008).

[0148] CLDN18.2 экспрессируется в ряде первичных опухолей и их метастазах, включая рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, например, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи, и рак желчного пузыря. Дисрегулярная экспрессия клаудинов выявляется во многих видах рака и может способствовать туморигенезу и инвазивности рака (Singh

et al., J Oncology 2010; 2010: 541957). Экспрессия CLDN18.2 заметно повышена при аденокарциномах протоков поджелудочной железы (PDAC) (Tanaka et al., J Histochem Cytochem. 2011; 59:942-952), опухолях пищевода, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников (Sahin et al., Hu Cancer Biol. 2008; 14:7624-7634), и аденокарциномах желчных протоков (Keira et al., Virchows Arch. 2015; 466:265-277).

[0149] Несмотря на то, что рак желудка способствует значительной заболеваемости и смертности, связанной с раком, возможности лечения рака желудка ограничены. Клаудины присутствуют в нормальных тканях, доброкачественных новообразованиях, гиперпластических состояниях и раковых опухолях (Ding et al., Cancer Manag. Res. 5:367-375 (2013)). Экспрессия клаудинов является высоко тканеспецифичной, и большинство тканей экспрессируют несколько клаудинов. Белки клаудина могут взаимодействовать с клаудинами из соседних клеток гомотипическим или гетеротипическим образом, образуя плотные контакты (Ding et al.). Известно, что изменения в экспрессии клаудина и сигнальных путях связаны с развитием рака, и широко сообщалось об ассоциации между функцией нарушенных плотных контактов и прогрессированием опухоли.

Антитела к CLDN18.2

[0150] Антитела к CLDN18, в частности человеческие и мышиные моноклональные антитела к CLDN18.2, которые специфически связываются с первым внеклеточным доменом/петлей CLDN18.2. Связывание моноклонального антитела к CLDN18.2 или антигенсвязывающего фрагмента с CLDN18.2 может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗКФ) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или другие эффекты, которые приводят к гибели раковой клетки-мишени. Альтернативно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, служить для доставки конъюгированного цитотоксического лекарственного средства, и/или может образовывать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом для опосредованной гибели раковой клетки-мишени.

[0151] В одном из вариантов осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты антител содержат VH, имеющую набор CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), описанных в таблице 1 или таблице 2. Например, антитела к CLDN18 или их фрагменты могут содержать набор CDR, соответствующих CDR одной или более тяжелых цепей антитела к CLDN18.2, описанных в таблице 2 (например, CDR антитела Hu-1).

[0152] В другом варианте осуществления антитела к CLDN18.2 содержат VL, имеющие набор CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), как описано в таблице 3 или таблице 4. Например, антитела к CLDN18 или их фрагменты могут содержать набор CDR, соответствующих CDR одной или более легких цепей антител к CLDN18.2, описанных в таблице 4 (например, CDR антитела Hu-1).

[0153] В альтернативном варианте осуществления антитела к CLDN18 или их фрагменты антител содержат VH, имеющую набор CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), как описано в таблице 1, и VL, имеющую набор CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), как описано в таблице 3.

[0154] В альтернативном варианте осуществления антитела к CLDN18 или их фрагменты антител содержат VH, имеющую набор CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), как описано в таблице 2, и VL, имеющую набор CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), как описано в таблице 4.

[0155] В конкретном варианте осуществления антитело к CLDN18.2 может содержать набор из шести (6) CDR, полученных из одного мышиного антитела (CDR VH в таблице 1 и CDR VL в таблице 3) или полностью человеческого антитела (CDR VH в таблице 2 и CDR VL в таблице 4). Например, антитело может содержать набор из шести областей CDR, полученных из полностью человеческого антитела к CLDN18.2 «Hu-1». В этом случае связывающий агент будет содержать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 221-223

и SEQ ID NO: 224-226, представляющие последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных доменов тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельных доменов легкой цепи, соответственно, антитела Hu-1.

Таблица 1. Последовательности CDR мышиных вариабельных доменов тяжелой цепи

мкАт к CLDN18.2	CDR1	CDR2	CDR3
Ms1	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49
Ms2	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55
Ms3	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61
Ms4	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67
Ms5	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
Ms6	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
Ms7	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85
Ms8	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 91
Ms9	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 97
Ms10	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 103
Ms11	SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 109
Ms12	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 115
Ms13	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 121
Ms14	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 127
Ms15	SEQ ID NO: 131	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 133
Ms16	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 139
Ms17	SEQ ID NO: 143	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 145
Ms18	SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150	SEQ ID NO: 151
Ms19	SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 157
Ms20	SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 162	SEQ ID NO: 163
Ms21	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 169
Ms22	SEQ ID NO: 173	SEQ ID NO: 174	SEQ ID NO: 175
Ms23	SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 180	SEQ ID NO: 181

Таблица 2. Последовательности CDR человеческих вариабельных доменов тяжелой цепи

мкАт к CLDN18.2	CDR1	CDR2	CDR3
Hu-1	SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 222	SEQ ID NO: 223
Hu-2	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 228	SEQ ID NO: 229
Hu-3	SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 235
Hu-4	SEQ ID NO: 239	SEQ ID NO: 240	SEQ ID NO: 241
Hu-5	SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 246	SEQ ID NO: 247
Hu-6	SEQ ID NO: 251	SEQ ID NO: 252	SEQ ID NO: 253
Hu-7	SEQ ID NO: 257	SEQ ID NO: 258	SEQ ID NO: 259
Hu-8	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 265
Hu-9	SEQ ID NO: 269	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 271
Hu-10	SEQ ID NO: 275	SEQ ID NO: 276	SEQ ID NO: 277
Hu-11	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 283
Hu-12	SEQ ID NO: 287	SEQ ID NO: 288	SEQ ID NO: 289

Hu-13	SEQ ID NO: 293	SEQ ID NO: 294	SEQ ID NO: 295
Hu-14	SEQ ID NO: 299	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 301
Hu-16	SEQ ID NO: 311	SEQ ID NO: 312	SEQ ID NO: 313
Hu-17	SEQ ID NO: 317	SEQ ID NO: 318	SEQ ID NO: 319
Hu-18	SEQ ID NO: 323	SEQ ID NO: 324	SEQ ID NO: 325

Таблица 3. Последовательности CDR мышиных вариабельных доменов легкой цепи

мкАт к CLDN18.2	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
Ms1	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52
Ms2	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 58
Ms3	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64
Ms4	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 70
Ms5	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76
Ms6	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 82
Ms7	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88
Ms8	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 94
Ms9	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 101
Ms10	SEQ ID NO: 104	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 106
Ms11	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 112
Ms12	SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 118
Ms13	SEQ ID NO: 122	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 124
Ms14	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 130
Ms15	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 136
Ms16	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 141	SEQ ID NO: 142
Ms17	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 148
Ms18	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 154
Ms19	SEQ ID NO: 158	SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 160
Ms20	SEQ ID NO: 164	SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 166
Ms21	SEQ ID NO: 170	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 172
Ms22	SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 178
Ms23	SEQ ID NO: 182	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 184

Таблица 4. Последовательности CDR человеческих вариабельных доменов легкой цепи

мкАт к CLDN18.2	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**
Hu-1	SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 226
Hu-2	SEQ ID NO: 230	SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 232
Hu-3	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 238
Hu-4	SEQ ID NO: 242	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 244
Hu-5	SEQ ID NO: 248	SEQ ID NO: 249	SEQ ID NO: 250
Hu-6	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 255	SEQ ID NO: 256
Hu-7	SEQ ID NO: 260	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 262
Hu-8	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	SEQ ID NO: 268

Hu-9	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 273	SEQ ID NO: 274
Hu-10	SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 280
Hu-11	SEQ ID NO: 284	SEQ ID NO: 285	SEQ ID NO: 286
Hu-12	SEQ ID NO: 290	SEQ ID NO: 291	SEQ ID NO: 292
Hu-13	SEQ ID NO: 296	SEQ ID NO: 297	SEQ ID NO: 298
Hu-14	SEQ ID NO: 302	SEQ ID NO: 303	SEQ ID NO: 304
Hu-16	SEQ ID NO: 314	SEQ ID NO: 315	SEQ ID NO: 316
Hu-17	SEQ ID NO: 320	SEQ ID NO: 321	SEQ ID NO: 322
Hu-18	SEQ ID NO: 326	SEQ ID NO: 327	SEQ ID NO: 328

[0156] В одном из вариантов осуществления антитело может представлять собой моноклональное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело, или его антигенсвязывающие части, или биспецифический или полиспецифический связывающий агент, который специфически связывается с изоформой 2 CLDN18 человека.

[0157] В еще одном варианте осуществления антитела к CLDN18.2 или фрагмент антитела содержат определенные наборы/комбинации последовательностей определяющей комплементарность области (CDR), полученных из описанных доменов VH и/или VL антител к CLDN18.2.

[0158] В одном из вариантов осуществления антитело к CLDN8.2 или его фрагмент проявляет одно или более из следующих свойств: связывается преимущественно с изоформой 2 CLDN18, экспрессируемой опухолевыми клетками человека, не связывается с изоформой 1 CLDN18 (CLDN18.1), эффективно интернализуется из поверхности CLDN18.2-положительных клеток после связывания и способен направлять уничтожение CLDN18.2-положительных клеток, индуцирую лизис, опосредованный антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ).

[0159] В одном из вариантов осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты содержат VH, содержащую набор определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:

(i) CDR1: SEQ ID NO: 47, CDR2: SEQ ID NO: 48, CDR3: SEQ ID NO: 49;

(ii) CDR1: SEQ ID NO: 53, CDR2: SEQ ID NO: 54, CDR3: SEQ ID NO: 55;

(iii) CDR1: SEQ ID NO: 59, CDR2: SEQ ID NO: 60, CDR3: SEQ ID NO: 61;

(iv) CDR1: SEQ ID NO: 65, CDR2: SEQ ID NO: 66, CDR3: SEQ ID NO: 67;

(v) CDR1: SEQ ID NO: 71, CDR2: SEQ ID NO: 72, CDR3: SEQ ID NO: 73;

(vi) CDR1: SEQ ID NO: 77, CDR2: SEQ ID NO: 78, CDR3: SEQ ID NO: 79;

(vii) CDR1: SEQ ID NO: 83, CDR2: SEQ ID NO: 84, CDR3: SEQ ID NO: 85;

(viii) CDR1: SEQ ID NO: 89, CDR2: SEQ ID NO: 90, CDR3: SEQ ID NO: 91;

(ix) CDR1: SEQ ID NO: 95, CDR2: SEQ ID NO: 96, CDR3: SEQ ID NO: 97;

(x) CDR1: SEQ ID NO: 101, CDR2: SEQ ID NO: 102, CDR3: SEQ ID NO: 103;

(xi) CDR1: SEQ ID NO: 107, CDR2: SEQ ID NO: 108, CDR3: SEQ ID NO: 109;

(xii) CDR1: SEQ ID NO: 113, CDR2: SEQ ID NO: 114, CDR3: SEQ ID NO: 115;

(xiii) CDR1: SEQ ID NO: 119, CDR2: SEQ ID NO: 120, CDR3: SEQ ID NO: 121;

(xiv) CDR1: SEQ ID NO: 125, CDR2: SEQ ID NO: 126, CDR3: SEQ ID NO: 127;

(xv) CDR1: SEQ ID NO: 131, CDR2: SEQ ID NO: 132, CDR3: SEQ ID NO: 133;

(xvi) CDR1: SEQ ID NO: 137, CDR2: SEQ ID NO: 138, CDR3: SEQ ID NO: 139;

(xvii) CDR1: SEQ ID NO: 143, CDR2: SEQ ID NO: 144, CDR3: SEQ ID NO: 145;
(xviii) CDR1: SEQ ID NO: 149, CDR2: SEQ ID NO: 150, CDR3: SEQ ID NO: 151;
(xix) CDR1: SEQ ID NO: 155, CDR2: SEQ ID NO: 156, CDR3: SEQ ID NO: 157;
(xx) CDR1: SEQ ID NO: 161, CDR2: SEQ ID NO: 162, CDR3: SEQ ID NO: 163;
(xxi) CDR1: SEQ ID NO: 167, CDR2: SEQ ID NO: 168, CDR3: SEQ ID NO: 169;
(xxii) CDR1: SEQ ID NO: 173, CDR2: SEQ ID NO: 174, CDR3: SEQ ID NO: 175; и
(xxiii) CDR1: SEQ ID NO: 179, CDR2: SEQ ID NO: 180, CDR3: SEQ ID NO: 181.

[0160] В одном из вариантов осуществления специфические антитела к CLDN18.2 или их связывающие фрагменты содержат VL, содержащую набор определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:
(i) CDR1: SEQ ID NO: 50, CDR2: SEQ ID NO: 51, CDR3: SEQ ID NO: 52;
(ii) CDR1: SEQ ID NO: 56, CDR2: SEQ ID NO: 57, CDR3: SEQ ID NO: 58;
(iii) CDR1: SEQ ID NO: 62, CDR2: SEQ ID NO: 63, CDR3: SEQ ID NO: 64;
(iv) CDR1: SEQ ID NO: 68, CDR2: SEQ ID NO: 69, CDR3: SEQ ID NO: 70;
(v) CDR1: SEQ ID NO: 74, CDR2: SEQ ID NO: 75, CDR3: SEQ ID NO: 76;
(vi) CDR1: SEQ ID NO: 80, CDR2: SEQ ID NO: 81, CDR3: SEQ ID NO: 82;
(vii) CDR1: SEQ ID NO: 86, CDR2: SEQ ID NO: 87, CDR3: SEQ ID NO: 88;
(viii) CDR1: SEQ ID NO: 92, CDR2: SEQ ID NO: 93, CDR3: SEQ ID NO: 94;
(ix) CDR1: SEQ ID NO: 98, CDR2: SEQ ID NO: 99, CDR3: SEQ ID NO: 100;
(x) CDR1: SEQ ID NO: 104, CDR2: SEQ ID NO: 105, CDR3: SEQ ID NO: 106;
(xi) CDR1: SEQ ID NO: 110, CDR2: SEQ ID NO: 111, CDR3: SEQ ID NO: 112;
(xii) CDR1: SEQ ID NO: 116, CDR2: SEQ ID NO: 117, CDR3: SEQ ID NO: 118;
(xiii) CDR1: SEQ ID NO: 122, CDR2: SEQ ID NO: 123, CDR3: SEQ ID NO: 124;
(xiv) CDR1: SEQ ID NO: 128, CDR2: SEQ ID NO: 129, CDR3: SEQ ID NO: 130;
(xv) CDR1: SEQ ID NO: 134, CDR2: SEQ ID NO: 135, CDR3: SEQ ID NO: 136;
(xvi) CDR1: SEQ ID NO: 140, CDR2: SEQ ID NO: 141, CDR3: SEQ ID NO: 142;
(xvii) CDR1: SEQ ID NO: 146, CDR2: SEQ ID NO: 147, CDR3: SEQ ID NO: 148;
(xviii) CDR1: SEQ ID NO: 152, CDR2: SEQ ID NO: 153, CDR3: SEQ ID NO: 154;
(xix) CDR1: SEQ ID NO: 158, CDR2: SEQ ID NO: 159, CDR3: SEQ ID NO: 160;
(xx) CDR1: SEQ ID NO: 164, CDR2: SEQ ID NO: 165, CDR3: SEQ ID NO: 166;
(xxi) CDR1: SEQ ID NO: 170, CDR2: SEQ ID NO: 171, CDR3: SEQ ID NO: 172;
(xxii) CDR1: SEQ ID NO: 176, CDR2: SEQ ID NO: 177, CDR3: SEQ ID NO: 178; и
(xxiii) CDR1: SEQ ID NO: 182, CDR2: SEQ ID NO: 183, CDR3: SEQ ID NO: 184.

[0161] В одном из вариантов осуществления антитела, обладающие способностью связываться с CLDN18.2, содержат комбинацию VH и VL, каждая из которых включает набор определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:
(i) VH: CDR1: SEQ ID NO: 47, CDR2: SEQ ID NO: 48, CDR3: SEQ ID NO: 49, VL: CDR1: SEQ ID NO: 50, CDR2: SEQ ID NO: 51, CDR3: SEQ ID NO: 52;
(ii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 53, CDR2: SEQ ID NO: 54, CDR3: SEQ ID NO: 55, VL: CDR1: SEQ ID NO: 56, CDR2: SEQ ID NO: 57, CDR3: SEQ ID NO: 58;
(iii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 59, CDR2: SEQ ID NO: 60, CDR3: SEQ ID NO: 61, VL: CDR1: SEQ ID NO: 62, CDR2: SEQ ID NO: 63, CDR3: SEQ ID NO: 64;

(iv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 65, CDR2: SEQ ID NO: 66, CDR3: SEQ ID NO: 67, VL: CDR1: SEQ ID NO: 68, CDR2: SEQ ID NO: 69, CDR3: SEQ ID NO: 70;

(v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 71, CDR2: SEQ ID NO: 72, CDR3: SEQ ID NO: 73, VL: CDR1: SEQ ID NO: 74, CDR2: SEQ ID NO: 75, CDR3: SEQ ID NO: 76;

(vi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 77, CDR2: SEQ ID NO: 78, CDR3: SEQ ID NO: 79, VL: CDR1: SEQ ID NO: 80, CDR2: SEQ ID NO: 81, CDR3: SEQ ID NO: 82;

(vii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 83, CDR2: SEQ ID NO: 84, CDR3: SEQ ID NO: 85, VL: CDR1: SEQ ID NO: 86, CDR2: SEQ ID NO: 87, CDR3: SEQ ID NO: 88;

(viii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 89, CDR2: SEQ ID NO: 90, CDR3: SEQ ID NO: 91, VL: CDR1: SEQ ID NO: 92, CDR2: SEQ ID NO: 93, CDR3: SEQ ID NO: 94;

(ix) VH: CDR1: SEQ ID NO: 95, CDR2: SEQ ID NO: 96, CDR3: SEQ ID NO: 97, VL: CDR1: SEQ ID NO: 98, CDR2: SEQ ID NO: 99, CDR3: SEQ ID NO: 100;

(x) VH: CDR1: SEQ ID NO: 101, CDR2: SEQ ID NO: 102, CDR3: SEQ ID NO: 103, VL: CDR1: SEQ ID NO: 104, CDR2: SEQ ID NO: 105, CDR3: SEQ ID NO: 106;

(xi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 107, CDR2: SEQ ID NO: 108, CDR3: SEQ ID NO: 109, VL: CDR1: SEQ ID NO: 110, CDR2: SEQ ID NO: 111, CDR3: SEQ ID NO: 112;

(xii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 113, CDR2: SEQ ID NO: 114, CDR3: SEQ ID NO: 115, VL: CDR1: SEQ ID NO: 116, CDR2: SEQ ID NO: 117, CDR3: SEQ ID NO: 118;

(xiii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 119, CDR2: SEQ ID NO: 120, CDR3: SEQ ID NO: 121, VL: CDR1: SEQ ID NO: 122, CDR2: SEQ ID NO: 123, CDR3: SEQ ID NO: 124;

(xiv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 125, CDR2: SEQ ID NO: 126, CDR3: SEQ ID NO: 127, VL: CDR1: SEQ ID NO: 128, CDR2: SEQ ID NO: 129, CDR3: SEQ ID NO: 130;

(xv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 131, CDR2: SEQ ID NO: 132, CDR3: SEQ ID NO: 133, VL: CDR1: SEQ ID NO: 134, CDR2: SEQ ID NO: 135, CDR3: SEQ ID NO: 136;

(xvi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 137, CDR2: SEQ ID NO: 138, CDR3: SEQ ID NO: 139, VL: CDR1: SEQ ID NO: 140, CDR2: SEQ ID NO: 141, CDR3: SEQ ID NO: 142;

(xvii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 143, CDR2: SEQ ID NO: 144, CDR3: SEQ ID NO: 145, VL: CDR1: SEQ ID NO: 146, CDR2: SEQ ID NO: 147, CDR3: SEQ ID NO: 148;

(xviii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 149, CDR2: SEQ ID NO: 150, CDR3: SEQ ID NO: 151, VL: CDR1: SEQ ID NO: 152, CDR2: SEQ ID NO: 153, CDR3: SEQ ID NO: 154;

(xix) VH: CDR1: SEQ ID NO: 155, CDR2: SEQ ID NO: 156, CDR3: SEQ ID NO: 157, VL: CDR1: SEQ ID NO: 158, CDR2: SEQ ID NO: 159, CDR3: SEQ ID NO: 160;

(xx) VH: CDR1: SEQ ID NO: 161, CDR2: SEQ ID NO: 162, CDR3: SEQ ID NO: 163, VL: CDR1: SEQ ID NO: 164, CDR2: SEQ ID NO: 165, CDR3: SEQ ID NO: 166;

(xxi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 167, CDR2: SEQ ID NO: 168, CDR3: SEQ ID NO: 169, VL: CDR1: SEQ ID NO: 170, CDR2: SEQ ID NO: 171, CDR3: SEQ ID NO: 172;

(xxii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 173, CDR2: SEQ ID NO: 174, CDR3: SEQ ID NO: 175, VL: CDR1: SEQ ID NO: 176, CDR2: SEQ ID NO: 177, CDR3: SEQ ID NO: 178; и

(xxiii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 179, CDR2: SEQ ID NO: 180, CDR3: SEQ ID NO: 181, VL: CDR1: SEQ ID NO: 182, CDR2: SEQ ID NO: 183, CDR3: SEQ ID NO: 184.

[0162] В одном из вариантов осуществления полностью человеческие антитела к CLDN18.2 или их антигенсвязывающие фрагменты содержат VH, содержащую набор определяющих комплементарность

областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:

(i) CDR1: SEQ ID NO: 221, CDR2: SEQ ID NO: 222, CDR3: SEQ ID NO: 223;

(ii) CDR1: SEQ ID NO: 227, CDR2: SEQ ID NO: 228, CDR3: SEQ ID NO: 229;

(iii) CDR1: SEQ ID NO: 233, CDR2: SEQ ID NO: 234, CDR3: SEQ ID NO: 235;

(iv) CDR1: SEQ ID NO: 239, CDR2: SEQ ID NO: 240, CDR3: SEQ ID NO: 241;

(v) CDR1: SEQ ID NO: 245, CDR2: SEQ ID NO: 246, CDR3: SEQ ID NO: 247;

(vi) CDR1: SEQ ID NO: 251, CDR2: SEQ ID NO: 252, CDR3: SEQ ID NO: 253;

(vii) CDR1: SEQ ID NO: 257, CDR2: SEQ ID NO: 258, CDR3: SEQ ID NO: 259;

(viii) CDR1: SEQ ID NO: 263, CDR2: SEQ ID NO: 264, CDR3: SEQ ID NO: 265;

(ix) CDR1: SEQ ID NO: 269, CDR2: SEQ ID NO: 270, CDR3: SEQ ID NO: 271;

(x) CDR1: SEQ ID NO: 275, CDR2: SEQ ID NO: 276, CDR3: SEQ ID NO: 277;

(xi) CDR1: SEQ ID NO: 281, CDR2: SEQ ID NO: 282, CDR3: SEQ ID NO: 283;

(xii) CDR1: SEQ ID NO: 287, CDR2: SEQ ID NO: 288, CDR3: SEQ ID NO: 289;

(xiii) CDR1: SEQ ID NO: 293, CDR2: SEQ ID NO: 294, CDR3: SEQ ID NO: 295;

(xiv) CDR1: SEQ ID NO: 299, CDR2: SEQ ID NO: 300, CDR3: SEQ ID NO: 301;

(xv) CDR1: SEQ ID NO: 311, CDR2: SEQ ID NO: 312, CDR3: SEQ ID NO: 313;

(xvi) CDR1: SEQ ID NO: 317, CDR2: SEQ ID NO: 318, CDR3: SEQ ID NO: 319; и

(xvii) CDR1: SEQ ID NO: 323, CDR2: SEQ ID NO: 324, CDR3: SEQ ID NO: 325.

[0163] В одном из вариантов осуществления полностью человеческие антитела к CLDN18.2 или их антигенсвязывающие фрагменты содержат VL, содержащую набор определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:

(i) CDR1: SEQ ID NO: 224, CDR2: SEQ ID NO: 225, CDR3: SEQ ID NO: 226;

(ii) CDR1: SEQ ID NO: 230, CDR2: SEQ ID NO: 231, CDR3: SEQ ID NO: 232;

(iii) CDR1: SEQ ID NO: 236, CDR2: SEQ ID NO: 237, CDR3: SEQ ID NO: 238;

(iv) CDR1: SEQ ID NO: 242, CDR2: SEQ ID NO: 243, CDR3: SEQ ID NO: 244;

(v) CDR1: SEQ ID NO: 248, CDR2: SEQ ID NO: 249, CDR3: SEQ ID NO: 250;

(vi) CDR1: SEQ ID NO: 254, CDR2: SEQ ID NO: 255, CDR3: SEQ ID NO: 256;

(vii) CDR1: SEQ ID NO: 260, CDR2: SEQ ID NO: 261, CDR3: SEQ ID NO: 262;

(viii) CDR1: SEQ ID NO: 266, CDR2: SEQ ID NO: 267, CDR3: SEQ ID NO: 268;

(ix) CDR1: SEQ ID NO: 272, CDR2: SEQ ID NO: 273, CDR3: SEQ ID NO: 274;

(x) CDR1: SEQ ID NO: 278, CDR2: SEQ ID NO: 279, CDR3: SEQ ID NO: 280;

(xi) CDR1: SEQ ID NO: 284, CDR2: SEQ ID NO: 285, CDR3: SEQ ID NO: 286;

(xii) CDR1: SEQ ID NO: 290, CDR2: SEQ ID NO: 291, CDR3: SEQ ID NO: 292;

(xiii) CDR1: SEQ ID NO: 296, CDR2: SEQ ID NO: 297, CDR3: SEQ ID NO: 298;

(xiv) CDR1: SEQ ID NO: 302, CDR2: SEQ ID NO: 303, CDR3: SEQ ID NO: 304;

(xv) CDR1: SEQ ID NO: 314, CDR2: SEQ ID NO: 315, CDR3: SEQ ID NO: 316;

(xvi) CDR1: SEQ ID NO: 320, CDR2: SEQ ID NO: 321, CDR3: SEQ ID NO: 322; и

(xvii) CDR1: SEQ ID NO: 326, CDR2: SEQ ID NO: 327, CDR3: SEQ ID NO: 328.

[0164] SEQ ID NO и аминокислотные последовательности вариабельных доменов (VH и VL) и CDR мышиных антител к CLDN18.2 представлены на Фиг. 1.

[0165] SEQ ID NO и аминокислотные последовательности вариабельных доменов (VH и VL) и CDR человеческого антитела к CLDN18.2 представлены на Фиг. 2.

[0166] В одном из вариантов осуществления антитела, обладающие способностью связываться с CLDN18.2, содержат комбинацию VH и VL, каждая из которых включает набор определяющих комплементарность областей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из группы, состоящей из:

(i) VH: CDR1: SEQ ID NO: 221, CDR2: SEQ ID NO: 222, CDR3: SEQ ID NO: 223, VL: CDR1: SEQ ID NO: 224, CDR2: SEQ ID NO: 225, CDR3: SEQ ID NO: 226;

(ii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 227, CDR2: SEQ ID NO: 228, CDR3: SEQ ID NO: 229, VL: CDR1: SEQ ID NO: 230, CDR2: SEQ ID NO: 231, CDR3: SEQ ID NO: 232;

(iii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 233, CDR2: SEQ ID NO: 234, CDR3: SEQ ID NO: 235, VL: CDR1: SEQ ID NO: 236, CDR2: SEQ ID NO: 237, CDR3: SEQ ID NO: 238;

(iv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 239, CDR2: SEQ ID NO: 240, CDR3: SEQ ID NO: 241, VL: CDR1: SEQ ID NO: 242, CDR2: SEQ ID NO: 243, CDR3: SEQ ID NO: 244;

(v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 245, CDR2: SEQ ID NO: 246, CDR3: SEQ ID NO: 247, VL: CDR1: SEQ ID NO: 248, CDR2: SEQ ID NO: 249, CDR3: SEQ ID NO: 250;

(vi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 251, CDR2: SEQ ID NO: 252, CDR3: SEQ ID NO: 253, VL: CDR1: SEQ ID NO: 254, CDR2: SEQ ID NO: 255, CDR3: SEQ ID NO: 256;

(vii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 257, CDR2: SEQ ID NO: 258, CDR3: SEQ ID NO: 259, VL: CDR1: SEQ ID NO: 260, CDR2: SEQ ID NO: 261, CDR3: SEQ ID NO: 262;

(viii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 263, CDR2: SEQ ID NO: 264, CDR3: SEQ ID NO: 265, VL: CDR1: SEQ ID NO: 266, CDR2: SEQ ID NO: 267, CDR3: SEQ ID NO: 268;

(ix) VH: CDR1: SEQ ID NO: 269, CDR2: SEQ ID NO: 270, CDR3: SEQ ID NO: 271, VL: CDR1: SEQ ID NO: 272, CDR2: SEQ ID NO: 273, CDR3: SEQ ID NO: 274;

(x) VH: CDR1: SEQ ID NO: 275, CDR2: SEQ ID NO: 276, CDR3: SEQ ID NO: 277. VL: CDR1: SEQ ID NO: 278, CDR2: SEQ ID NO: 279, CDR3: SEQ ID NO: 280;

(xi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 281, CDR2: SEQ ID NO: 282, CDR3: SEQ ID NO: 283, VL: CDR1: SEQ ID NO: 284, CDR2: SEQ ID NO: 285, CDR3: SEQ ID NO: 286;

(xii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 287, CDR2: SEQ ID NO: 288, CDR3: SEQ ID NO: 289, VL: CDR1: SEQ ID NO: 290, CDR2: SEQ ID NO: 291, CDR3: SEQ ID NO: 292;

(xiii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 293, CDR2: SEQ ID NO: 294, CDR3: SEQ ID NO: 295, VL: CDR1: SEQ ID NO: 296, CDR2: SEQ ID NO: 297, CDR3: SEQ ID NO: 298;

(xiv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 299, CDR2: SEQ ID NO: 300, CDR3: SEQ ID NO: 301, VL: CDR1: SEQ ID NO: 302, CDR2: SEQ ID NO: 303, CDR3: SEQ ID NO: 304;

(xv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 311, CDR2: SEQ ID NO: 312, CDR3: SEQ ID NO: 313, VL: CDR1: SEQ ID NO: 314, CDR2: SEQ ID NO: 315, CDR3: SEQ ID NO: 316;

(xvi) VH: CDR1: SEQ ID NO: 317, CDR2: SEQ ID NO: 318, CDR3: SEQ ID NO: 319, VL: CDR1: SEQ ID NO: 320, CDR2: SEQ ID NO: 321, CDR3: SEQ ID NO: 322; и

(xvii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 323, CDR2: SEQ ID NO: 324, CDR3: SEQ ID NO: 325, VL: CDR1: SEQ ID NO: 326, CDR2: SEQ ID NO: 327, CDR3: SEQ ID NO: 328.

[0167] В одном из вариантов осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты антител содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 215, 217 и 219 и/или последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36,

38, 40, 42, 44, 46, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218 и 220.

[0168] В одном из вариантов осуществления антитело к CLDN18.2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит специфическую пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций: последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 1, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 2; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 4; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 5, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 6; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 8; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 9, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 10; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 12; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 13, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 14; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 15, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 16; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 17, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 18; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 19, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 20; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 21, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 22; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 23, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 24; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 25, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 26; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 27, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 28; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 30; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 32; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 33, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 34; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 35, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 36; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 37, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 38; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 40; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 41, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 42; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 43, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO:44; и последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO:45, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO:46.

[0169] В альтернативном варианте осуществления полностью человеческие антитела к CLDN18.2 или их антигенсвязывающий фрагмент содержат специфическую пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций: последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 185, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 186; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 187, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 188; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 189, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 190; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 191, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 192; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 193, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 194; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 195, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 196; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 197, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 198; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 199, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 200; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 201, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 202; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 203, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 204; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 205, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 206; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 207, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 208; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 209, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 210; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 211, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 212; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 215, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 216; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 217, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 218; и последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 220.

[0170] В альтернативном варианте осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты содержат пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций: последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 2; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 4; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 5, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 6; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 7, и последовательность

вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 8; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 9, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 10; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 12; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 13, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 14; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 15, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 16; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 17, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 18; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 19, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 20; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 21, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 22; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 23, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 24; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 25, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 26; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 27, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 28; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 30; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 32; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 33, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 34; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 35, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 36; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 37, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 38; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 40; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 41, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 42; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 43, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 44; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 45, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%,

95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 46.

[0171] В другом альтернативном варианте осуществления антитела к CLDN18.2 или их фрагменты антител содержат пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из следующих комбинаций: последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 185, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 186; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 187, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 188; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 189, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 190; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 191, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 192; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 193, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 194; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 195, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 196; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 197, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 198; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 199, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 200; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 201, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 202; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 203, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 204; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 205, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 206; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 207, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 208; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 209, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 210; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 211, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 212; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 215, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 216; последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 217, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 218;. последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95%, или 99% идентична SEQ ID NO: 220.

[0172] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полноразмерное антитело. В

других вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, включая, например, фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab)2, Fv, доменных антител (dAb) и фрагментов определяющих комплементарность области (CDR), одноцепочечных антител (scFv), химерных антител, диател, триател, тетрател, миниантител, полиспецифических антител, биспецифических антител и полипептидов, содержащих по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточную для CLDN18.2-специфического связывания с полипептидом.

[0173] Таким образом, в одном варианте осуществления фрагмент антитела содержит по меньшей мере один CDR, как описано в данном документе. Фрагмент антитела может содержать по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть CDR, как описано в данном документе. Фрагмент антитела далее может содержать по меньшей мере один вариабельную область антитела, описанного в данном документе. Вариабельная область может быть любого размера или аминокислотного состава и, как правило, содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, ответственную за специфическое связывание с CLDN18.2 человека, например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3, как описано в данном документе, и которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностям.

[0174] В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN8.2 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN8.2 представляет собой гуманизированное антитело. В альтернативных вариантах осуществления антитело к CLDN8.2 представляет собой мышиное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к CLDN8.2 представляет собой химерное антитело, биспецифическое антитело или гуманизированное антитело.

[0175] В некоторых вариантах осуществления антитела к CLDN8.2 или их фрагменты содержат одну или более консервативных аминокислотных замен. Специалист в данной области техники понимает, что консервативная аминокислотная замена представляет собой замену одной аминокислоты на другую аминокислоту, которая имеет сходные структурные или химические свойства, такие как, например, сходная боковая цепь. Иллюстративные консервативные замены описаны в данной области техники, например, в Watson et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Publication Company, 4th Ed. (1987).

[0176] «Консервативные модификации» означают модификации аминокислот, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего данные аминокислотные последовательности. Консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Консервативные замены представляют собой замены, при которых аминокислота заменяется на остаток аминокислоты с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, хорошо определены и включают аминокислоты с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидной группой (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде также может быть заменен на аланин, как было описано ранее для аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan et al. (1998) Acta Physiol Scand Suppl 643: 55-67; Sasaki et al. (1998) Adv Biophys 35: 1-24). Аминокислотные замены в антителах по изобретению могут быть сделаны известными способами,

например, путем ПЦР-мутагенеза (патент США № 4683195).

[0177] В одном варианте осуществления антитело к IL-CLDN18.2 или его фрагмент содержит все шесть областей CDR антител Ms1, Ms2, Ms3, Ms4, Ms5, Ms6, Ms7, Ms8, Ms9, Ms10, Ms11, Ms12, Ms13, Ms14, Ms15, Ms16, Ms17, Ms18, Ms19, Ms20, Ms21, Ms22 или Ms23 в формате химерного или гуманизированного антитела. В других вариантах осуществления антитело к CLDN18.2 или его фрагмент содержит все шесть областей CDR одного из описанных полностью человеческих антител.

[0178] В некоторых вариантах осуществления домен вариабельной области антитела к CLDN18.2, описанного в данном документе, может быть ковалентно присоединен на С-концевой аминокислоте по меньшей мере к одному другому домену антитела или его фрагменту. Так, например, домен VH, присутствующий в домене вариабельной области, может быть связан с доменом CH1 иммуноглобулина или его фрагментом. Аналогичным образом, домен VL может быть связан с доменом CK или его фрагментом. Таким образом, например, антитело может представлять собой фрагмент Fab, в котором антигенсвязывающий домен содержит ассоциированные домены VH и VL, ковалентно связанные на своих С-концах с доменами CH1 и CK, соответственно. Домен CH1 может быть расширен за счет других аминокислот, например, для обеспечения шарнирной области или части домена шарнирной области, как в фрагменте Fab, или для обеспечения других доменов, таких как домены CH2 и CH3 антител.

[0179] Антигенсвязывающие фрагменты, моноспецифические или полиспецифические антитела могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных антител. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab)2; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv). «Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител VH и VL, связанные в одну полипептидную цепь. Один или более раскрытых CDR, связывающих анти-CLDN18, могут быть включены в рекомбинантную молекулу ковалентно или нековалентно, чтобы сделать ее антигенсвязывающим белком в формате химерных антител, диател, триател, тетрател и полипептидов, которые содержат по меньшей мере часть иммуноглобулина, достаточного для придания полипептиду CLDN18-специфического связывания.

[0180] Таким образом, в одном варианте осуществления связывающий агент содержит по меньшей мере одну CDR, как описано в данном документе. Связывающий агент может содержать по меньшей мере два, три, четыре, пять или шесть CDR, как описано в данном документе. Связывающий агент также может содержать по меньшей мере один домен вариабельной области антитела, описанного в данном документе. Домен вариабельной области может быть любого размера или аминокислотного состава и, как правило, содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, ответственную за связывание с CLDN18.2 человека, например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 и/или CDR легкой цепи, конкретно описанные в данном документе, и которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностям.

[0181] В общем случае домен вариабельной (V) области может представлять собой любое подходящее расположение вариабельных доменов тяжелой (VH) и/или легкой (VL) цепи иммуноглобулина. Так, например, домен V-области может быть мономерным и представлять собой домен VH или VL, который способен независимо связывать CLDN18.2 человека, как описано ниже. Альтернативно, домен V-области может быть димерным и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Димер V-области содержит по меньшей мере одну цепь VH и по меньшей мере одну цепь VL, которые могут быть нековалентно связаны (далее FV). При желании, цепи могут быть ковалентно соединены либо напрямую, например, через дисульфидную связь между двумя вариабельными доменами, либо через линкер, например, пептидный

линкер, с образованием одноцепочечного Fv (scFV).

[0182] Специалист в данной области техники знает, что молекула иммуноглобулина IgG человека (антитело) состоит из четырех полипептидных цепей, состоящих из двух одинаковых 50 кДа γ тяжелых (H) цепей и двух одинаковых 25 кДа легких (L) κ- или λ- цепей, соединенных между собой межцепочечными дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевого вариабельного домена (VH) и области Fc, содержащей три константных домена (CH1, CH2, CH3), с дополнительной «шарнирной областью» между CH1 и CH2. Каждая легкая цепь состоит из N-концевого вариабельного домена (VL) и одного константного домена (CL). Два типа легких цепей, каппа (κ) и лямбда (λ), также были первоначально определены серологически, а впоследствии по последовательностям белков и генов. Каждый модуль H2L2 экспрессирует либо две легкие каппа-цепи, либо две легкие лямбда-цепи, образуя гетеродимеры H2κ2 или H2λ2.

[0183] Область Fc тяжелой цепи молекул IgG также содержит связывающий эпитоп, расположенный на поверхности взаимодействия между доменами CH2-CH3 Fc для неонатального Fc-рецептора (FcRn), который отвечает за трансплацентарный перенос и период полужизни IgG. Обычно вариабельные области антитела (домен VH и VL) участвуют в распознавании эпитопа на мишени, а функции фрагмента Fc обеспечивают биологические свойства антитела. Более конкретно, область Fc позволяет антителу распознаваться иммунными эффекторами (включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки и естественные киллеры или NK-клетки), экспрессирующими Fcγ-рецепторы, для активации системы комплемента и связывания с FcRn (неонатальный Fc-рецептор).

[0184] IgG человека состоит из четырех высококонсервативных подклассов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, которые демонстрируют более 90% гомологии в аминокислотной последовательности, со специфическими для подтипов различиями, которые влияют на их связывание со вспомогательными молекулами и рецепторами. Подклассы IgG отличаются друг от друга последовательностью их константной области, в частности, шарнирным и верхним доменами CH2, которые участвуют в связывании как с рецепторами IgG-Fc (Fcγ-рецепторы), так и с компонентом комплемента C1q. В результате различные подклассы IgG обладают различными эффекторными функциями, как в плане активации иммунных эффекторных клеток, так и в плане активации каскада комплемента. Типы FcγR-опосредованных ответов эффекторных клеток включают, но не ограничиваются ими, антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ), высвобождение цитокинов и захват антигена для презентации.

[0185] В дополнение к изотипической вариации, аллельные вариации также встречаются среди подклассов IgG. Эти полиморфные эпитопы иммуноглобулинов, которые могут отличаться у разных людей и этнических групп, были первоначально открыты на основе серологических данных, как иммуногенные детерминанты, обнаруженные на IgG одних людей, но не других. Аллотипы наследуются кодоминантным менделевским наследованием, и различные наборы комбинаций встречаются в африканских, белых и восточных популяциях.

[0186] Одним из наиболее часто используемых подклассов изотипа IgG для терапевтических антител является IgG1, который имеет четыре хорошо охарактеризованных аллотипа. Сообщается, что использование последовательностей IgG1, включающих альтернативные аллотипы, может изменять (увеличивать или уменьшать) аффинность связывания с рецептором FcRn и/или увеличивать стабильность комплекса, образованного модифицированным антителом и FcRn, тем самым влияя на фармакокинетику терапевтического антитела (US2018/0362624, и J. Immunol. 196(2):607 (2016), Ternant, D et al). В настоящее время лицензированы и представлены на рынке терапевтические препараты на основе мкАт IgG1 четырех преобладающих аллотипов. Следует отметить, что специалисты в данной области техники могут легко

определить подходящую последовательность CH IgG1 для использования с областями VH по изобретению.

[0187] В одном аспекте антитела к CLDN18.2, представленные в данном документе, включают специфическую пару вариабельных последовательностей тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи в комбинации с константной областью тяжелой цепи IgG1 человека дикого типа (CH) и областью легкой каппа-цепи человека дикого типа (CL). Например, не в целях ограничения, в изобретение представлены антитела к CLDN18.2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) по изобретению в комбинации с последовательностью константной области тяжелой цепи (CH) иммуноглобулина человека IgG1 дикого типа, выбранной из последовательностей, изложенных в SEQ ID NOS: 331-334, и легкую цепь иммуноглобулина человека дикого типа, имеющую вариабельную область легкой цепи по изобретению (VL) в комбинации с константной областью легкой цепи иммуноглобулина (CL). В некоторых аспектах область CL включает область легкой каппа-цепи человека, состоящую из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 335. На Фиг. 11A и 11B представлена информация о последовательности доменов CH IgG1 человека (Фиг. 11A) и домена каппа-цепи человека (Фиг. 11B), пригодные для применения в комбинации с последовательностями VH и VL по изобретению.

[0188] В еще одном аспекте антитела к CLDN18.2, представленные в данном документе, содержат область CH IgG1 человека, включающую модифицированный CH, которая содержит точечные мутации, введенные в последовательность для усиления желательной эффекторной функции, такой как активность АЗКЦ или АЗКФ, или для увеличения периода полужизни или стабильности антитела. В одном аспекте в изобретение представлено антитело к CLDN18.2, сконструированное или изготовленное таким образом, чтобы сделать его «пригодным для применения» в качестве противораковой иммунотерапии благодаря усиленной активности АЗКЦ, АЗКФ и/или КЗЦ. Более конкретно, в одном из аспектов изобретения представлено антитело к CLDN18.2, характеризующееся низким содержанием или отсутствием коровой фукозы IgG-Fc. Потенциальные преимущества нефукозилированного терапевтического антитела к CLDN18.2 включают возможность достижения терапевтической эффективности при более низких дозах, индукцию высокой клеточной цитотоксичности в отношении опухолевых клеток, которые экспрессируют низкие уровни CLDN18.2, и стимуляцию высокой эффекторной функции в NK-клетках, экспрессирующих низкоаффинные Fcγ-рецепторы CD16a.

[0189] В одном аспекте, но не в целях ограничения, изобретение относится к антителу к CLDN18.2, характеризующемуся низким содержанием или отсутствием коровой фукозы (не- или афукозилированных) антител IgG. Специалист в данной области техники легко поймет, что этот аспект изобретения может представлять собой химерное или гуманизированное антитело к CLDN18.2, содержащее вариабельные области (т.е. VH и VL), выбранные из пар последовательностей антител (VH и VL), или наборы CDR VH и VL на Фиг. 1. Альтернативно, антитело к CLDN18.2, характеризующееся низким содержанием коровой фукозы IgG или отсутствием ее, может иметь полностью человеческую последовательность, содержащую вариабельные области, выбранные из пар последовательностей антител (VH и VL) или наборов CDR VH и VL на Фиг. 2.

[0190] В одном аспекте антитела по изобретению содержат нефукозилированные антитела к CLDN18.2 или антитела к CLDN18.2, характеризующиеся низкими уровнями коровой фукозы IgG, содержащие пару последовательностей VH и VL, выбранных из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 202, и SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204, соответственно. В любом конкретном специфические вариабельные области антитела к CLDN18.2 могут быть в формате полноразмерного IgG, содержащего последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина IgG1 человека,

выбранную из SEQ ID NO: 331-334, и константной области легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 335.

[0191] В альтернативном аспекте изобретение относится к антителу к CLDN18.2, содержащему точечные мутации в целевых участках в области Fc для усиления активности АЗКЦ, и/или АЗКФ, и/или КЗЦ относительно активности такого же антитела (например, с такими же вариабельными областями VH и VL или набором из 6 последовательностей CDR), содержащего последовательность CH IgG1 человека дикого типа. Специалист в данной области техники легко поймет, что этот аспект изобретения может представлять собой химерное или гуманизированное антитело к CLDN18.2, содержащее вариабельные области (т.е. VH и VL), выбранные из пар последовательностей антител (VH и VL), или наборы CDR VH и VL на Фиг. 1. Альтернативно, Fc-сконструированное антитело к CLDN18.2, содержащее точечные мутации, может иметь полностью человеческую последовательность, содержащую вариабельные области, выбранные из пар последовательностей антител (VH и VL) или наборов VH и VL CDR на Фиг. 2.

[0192] В одном аспекте в изобретении представлены Fc-сконструированные специфические антитела к CLDN18.2, содержащие пару последовательностей VH и VL, выбранных из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 202, и SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204, соответственно. В любом конкретном специфические вариабельные области антитела к CLDN18.2 могут быть в формате полноразмерного IgG, содержащего последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина IgG1 человека, выбранную из SEQ ID NO: 331-334, и константной области легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, содержащей последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 335.

[0193] Например, и не в целях ограничения, в изобретении представлено Fc-сконструированное полностью человеческое антитело IgG1 к CLDN18.2, содержащее последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 201, в комбинации с модифицированной областью CH, которая содержит точечные мутации в области CH1 и/или CH2, и/или CH3, предназначенные для усиления желательной биологической активности; и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 202, в комбинации с последовательностью легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, такой как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 335. В одном аспекте, но не в целях ограничения, изобретение относится к антителу к CLDN18.2, называемому в данном документе как мкАт NBL-014, которое содержит рекомбинантную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 336, и легкую цепь, включающую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 337 (см. Фиг. 12). В альтернативном варианте осуществления в изобретении представлено антитело к CLDN18.2, содержащее рекомбинантную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и легкую цепь, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 337, называемую в данном документе как NBL-014 (см. Фиг. 12).

[0194] В альтернативном аспекте, в изобретении представлено Fc-сконструированное полностью человеческое антитело IgG1 к CLDN18.2, содержащее последовательность VH, представленную в SEQ ID NO: 203, в комбинации с модифицированной областью CH, которая содержит точечные мутации в области CH1 и/или CH2, и/или CH3, предназначенные для усиления желательной биологической активности; и последовательность VL, представленную в SEQ ID NO: 204, в комбинации с последовательностью легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, такой как последовательность, представленная в SEQ ID NO: 335.

[0195] В альтернативном аспекте в изобретении представлены Fc-модифицированные, гликомодифицированные или белок-сконструированные (например, путем введения точечных мутаций в область Fc CH) специфические антитела к CLDN18.2, содержащие последовательность VH, которая содержат области CDR1, CDR2 и CDR3, выбранные из наборов CDR VH и VL, представленных на Фиг. 1 и 2. Более

конкретно, изобретение относится к сконструированным антителам к CLDN18.2 с доменом VH, содержащим набор последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из SEQ ID NO: 47-49, SEQ ID NO: 53-55, SEQ ID NO: 269-271, и SEQ ID NO: 275-277, в комбинации со сконструированной областью CH, которая содержит точечные мутации в области CH1 и/или CH2, и/или CH3, сконструированные для усиления желаемой биологической активности, в комбинации с последовательностью VL, содержащей набор последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из SEQ ID NO: 50-52, SEQ ID NO: 56-58, SEQ ID NO: 272-274 и SEQ ID NO: 278-280, соответственно, в комбинации с легкой каппа-цепью последовательность иммуноглобулина человека.

[0196] Терапевтическая ценность антител по изобретению может быть повышена путем конъюгирования с цитотоксическим лекарственным средством или агентом, что повышает их эффективность и активность. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС), содержащий антитело, специфичное для CLDN18.2, соединенное с цитотоксическим эффекторным агентом, таким как радиоизотоп, лекарственное средство или цитотоксин. Интернализация путем эндоцитоза указывает на то, что антитело подходит для разработки конъюгата антитело-лекарственное средство (КАЛС). Антитела к CLDN18.2, обладающие этими свойствами, также могут применяться, но не ограничиваются этим, в биспецифических, химерных антигенных рецепторах Т- или NK-клеток, клеточной терапии и комбинированной терапии для лечения CLDN18.2-ассоциированных заболеваний или расстройств.

[0197] Антитела к CLDN18.2 по изобретению также могут быть использованы для разработки иммунотерапевтических средств на основе антител, которые основаны на CLDN18.2-специфическом связывании для направления эффекторных клеток пациента (например, Т-клеток или NK-клеток) к опухолям, включая биспецифические антитела, привлекающие Т-клетки, или биспецифические молекулы, перенаправляющие NK-клетки, или клеточные терапии, такие как CAR-T-терапия.

Способы получения антител

[0198] Для получения антител можно применять множество подходящих способов, которые известны специалистам в данной области техники. Например, реципиент может быть иммунизирован клетками, экспрессирующими клаудин 18.2, растворимым рекомбинантным белком клаудином 18.2 или его фрагментом или пептидом, конъюгированным с белком-носителем. Любой подходящий способ, известный специалистам в данной области техники, может быть использован для получения антитела с желаемыми биологическими свойствами для ингибирования клаудина 18.2. Такие способы могут включать способ иммунизации, включающий применение адъювантов, других иммуностимуляторов, повторные бустер-иммунизации и применение одного или более путей иммунизации.

[0199] Любой подходящий источник клаудина 18.2 может быть использован в качестве иммуногена для получения нечеловеческого антитела или человеческого антитела, специфичного для клаудина 18.2 из композиций и способов, описанных в данном документе. Такие формы включают, но не ограничиваются клетками, экспрессирующими клаудин 18.2 (эндогенные клетки или клетки, трансфицированные геном клаудина 18.2), цельный белок, пептид(ы) и эпитопы, полученные с помощью рекомбинантных, синтетических, химических или ферментативных средств деградации, известных в данной области техники.

[0200] Для получения антитела, достаточного для образования биологически активного антитела, могут быть использованы различные формы антигенов. Таким образом, стимулирующим антигеном может быть один эпитоп, несколько эпитопов или весь белок отдельно или в комбинации с одним или более агентами, повышающими иммуногенность. В некоторых случаях вызывающий антиген представляет собой выделенный полноразмерный белок, белок клеточной поверхности (например, иммунизация клетками,

трансфицированными по меньшей мере частью антигена) или растворимый белок (например, иммунизация только частью внеклеточного домена белка).

[0201] В некоторых вариантах осуществления антиген продуцируется в генетически модифицированной клетке. ДНК, кодирующая антиген, может быть геномной или негеномной (например, кДНК) и может кодировать по меньшей мере часть внеклеточного домена. В контексте данного документа термин «часть» относится к минимальному количеству аминокислот или нуклеиновых кислот, в зависимости от ситуации, чтобы составить иммуногенный эпитоп представляющего интерес антигена. Можно использовать любые генетические векторы, подходящие для трансформации представляющих интерес клеток, включая, но не ограничиваясь ими, аденовирусные векторы, плазмиды и невирусные векторы, такие как катионные липиды.

[0202] Желательно получать моноклональные антитела (мкАт) из различных млекопитающих-хозяев, таких как мыши, грызуны, приматы, люди и т.д. Описание методов получения таких моноклональных антител можно найти, например, в Sties et al. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4^{th} ed.) Lance Medical Publication, Los Altos, CA, и цитируемых там ссылках; Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2D ed) Academic Press, New York, NY. Как правило, клетки селезенки животного, иммунизированного желаемым антигеном, иммортализуют, обычно путем слияния с клеткой миеломы. См. Kohler and Milstein (196) Eur. J. Immunol. 6:511-519. Альтернативные способы иммортализации включают трансформацию вирусом Эпштейна — Барра, онкогеном или ретровирусами, или другие способы, известные в данной области техники. См., например, Doyle et al. (eds. 1994 and periodic supplements) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY. Колонии, возникающие из единичных иммортализованных клеток, подвергаются скринингу на продукцию антител с желаемой специфичностью и аффинностью к антигену, и выход моноклональных антител, продуцируемых такими клетками, может быть увеличен с помощью различных методик, включая инъекцию в перитонеальную полость позвоночного-хозяина. Альтернативно, можно выделить последовательности ДНК, которые кодируют моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, путем скрининга библиотеки ДНК из В-клеток человека в соответствии с общим протоколом, изложенным в Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281. Таким образом, моноклональные антитела могут быть получены различными методами известными исследователям в данной области техники.

[0203] Другие подходящие методы включают селекцию библиотек антител в фаговом, дрожжевом, вирусном или подобном векторе. См., например, Huse et al. supra; and Ward et al. (1989) Nature 341:544-546. Полипептиды и антитела по настоящему изобретению могут применяться с модификацией или без нее, включая химерные или гуманизированные антитела. Часто полипептиды и антитела метят путем ковалентного или нековалентного присоединения вещества, которое обеспечивает детектируемый сигнал. Известен широкий спектр меток и методов конъюгации, о которых много сообщается как в научной, так и в патентной литературе. Подходящие метки включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, магнитные частицы и тому подобное. Патенты, в которых описано применение таких меток, включают патенты США №№. 3817837; 3850752; 39396345; 4277437; 4275149; и 4366241. Рекомбинантные иммуноглобулины также могут быть получены, см. патент США № 4816567, выданный Cabilly; и Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10023; или созданы в трансгенных мышах, см. Nils Lonberg et al. (1994), Nature 368:856-859; и Mendez et al. (1997) Nature Genetics 15: 146-156; TRANSGENIC ANIMALS AND METHODS OF USE (WO2012US62118A), Medarex, Trianni, Abgenix, Ablexis, OminiAb, Harbour, и с помощью других технологий.

[0204] В некоторых вариантах осуществления способность полученного антитела связывать антиген (например, CLDN18) можно оценить с помощью стандартных анализов связывания, таких как ИФА, анализ методом вестерн-блоттинга, иммунофлуоресцентный анализ и анализ методом проточной цитометрии. В некоторых аспектах полученное антитело также может быть оценено на способность опосредованно уничтожать клетки-мишени (например. опухолевых клеток), экспрессирующих CLDN18 (например, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗКФ) и/или ингибирование клеточной пролиферации).

[0205] Композиция антител, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, с помощью хроматографии с гидроксиапатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является типичным методом очистки. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А может быть использован для очистки антител, которые основаны на человеческих тяжелых цепях гамма1, гамма2 или гамма4 (см., например, Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). Белок G рекомендуется для всех мышиных изотипов и для человеческого гамма3 (см., например, Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). Матрица, к которой прикрепляется аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но возможны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стирендивинил)бензол, позволяют увеличить скорость потока и сократить время обработки по сравнению с агарозой. Если антитело содержит домен C_{H3}, для очистки пригодна смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси). Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин – SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония, также доступны в зависимости от антитела, которое необходимо выделить.

[0206] После любой стадии(-й) предварительной очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и загрязняющие вещества, может быть подвергнута хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с использованием буфера для элюирования при pH около 2,5-4,5, как правило, проводимой при низкой концентрации соли (например, около 0-0,25 М соли).

[0207] Также включены нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются в условиях низкой, умеренной и высокой жесткости, как определено в данном документе, со всей или частью (например, частью, кодирующей вариабельную область) нуклеотидной последовательности, представленной выделенной полинуклеотидной последовательностью(-ями), которая кодирует антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению. Гибридизирующая часть гибридизирующей нуклеиновой кислоты обычно имеет длину по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30 или 50) нуклеотидов. Гибридизирующая часть гибридизирующей нуклеиновой кислоты на по меньшей мере 80%, например, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 98% идентична последовательности части или всей нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид к CLDN18 (например, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи), или ее комплементарной цепи. Гибридизирующие нуклеиновые кислоты описанного в данном документе типа могут быть использованы, например, в качестве зонда для клонирования, праймера, например, праймера для ПЦР, или диагностического зонда.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[0208] Другие варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую антитело к CLDN18.2 или его фрагмент, векторы и клетки-хозяева, включающие полинуклеотиды, и рекомбинантные методы получения антитела. Выделенные полинуклеотиды могут кодировать любую желаемую форму антитела к CLDN18.2, включая, например, полноразмерные моноклональные антитела, фрагменты Fab, Fab′, $F(ab')_2$ и Fv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0209] Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют вариабельную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 185, 187, 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 215, 217, или 219. Некоторые варианты осуществления включают выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют вариабельную область легкой цепи антитела или фрагмента антитела, имеющего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 216, 218, или 220.

[0210] В одном из вариантов осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность(-и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 1, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 2;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 4;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 5, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 6;

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 8;

(e) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 9, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 10;

(f) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 12;

(g) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 13, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 14;

(h) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 15, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 16;

(i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 17, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 18;

(j) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 19, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 20;

(k) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 21, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 22;

(l) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 23, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 24;

(m) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 25, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 26;

(n) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 27, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 28;

(o) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 30;

(p) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 32;

(q) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 33, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 34;

(r) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 35, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 36;

(s) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 37, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 38;

(t) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 40;

(u) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 41, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 42;

(v) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 43, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 44; или

(w) и последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 45, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 46.

[0211] В еще одном варианте осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность(-и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности:

(aa) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 185, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 186;

(bb) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:187, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:188;

(cc) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:189, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:190;

(dd) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:191, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:192;

(ee) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:193, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:194;

(ff) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:195, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:196;

(gg) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:197, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:198;

(hh) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:199, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:200;

(ii) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:201, и

последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:202;

(jj) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:203, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:204;

(kk) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:205, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:206;

(ll) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:207, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:208;

(mm) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:209, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:210;

(nn) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:211, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:212;

(oo) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:215, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:216;

(pp) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO: 217, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO: 218; или

(qq) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающая SEQ ID NO:219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, включающая SEQ ID NO:220.

[0212] В альтернативном варианте осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность(-и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности:

(aa) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 185, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 186;

(bb) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 187, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 188;

(cc) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 189, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 190;

(dd) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 191, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 192;

(ee) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 193, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 194;

(ff) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 195, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 196;

(gg) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 197, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 198;

(hh) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ

ID NO: 199, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 200;

(ii) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 201, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 202;

(jj) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 203, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 204;

(kk) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 205, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 206;

(ll) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 207, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 208;

(мм) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 209, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 210;

(nn) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 211, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 212;

(oo) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 215, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 216;

(pp) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 217, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 218; или

(qq) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 219, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 220.

[0213] В альтернативном варианте осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность(-и) кодирует антитело или фрагмент антитела, имеющее вариабельную область легкой цепи и тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 1, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 2;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 3, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 4;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 5, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 6;

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ

ID NO: 7, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 8;

(e) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 9, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 10;

(f) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 11, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 12;

(g) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 13, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 14;

(h) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 15, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 16;

(i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 17, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 18;

(j) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 19, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 20;

(k) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 21, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 22;

(l) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 23, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 24;

(m) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 25, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 26;

(n) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 27, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 28;

(o) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 30;

(p) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 32;

(q) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 33, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 34;

(r) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID

NO: 35, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 36;

(s) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 37, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 38;

(t) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 40;

(u) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 41, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 42;

(v) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 43, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 44; или

(w) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 45, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на 90%, 95% или 99% идентична SEQ ID NO: 46.

[0214] Полинуклеотид(-ы), который содержит последовательность, кодирующую антитело к CLDN18.2 или его фрагмент, может быть слит с одной или более регуляторными или контрольными последовательностями, как известно в данной области, и может содержаться в подходящих векторах экспрессии или клетках-хозяевах. как известно в данной области техники. Каждая из полинуклеотидных молекул, кодирующих вариабельные домены тяжелой или легкой цепи, может быть независимо слита с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей константный домен, такой как человеческий константный домен, что позволяет продуцировать интактные антитела. Альтернативно, полинуклеотиды или их части могут быть слиты вместе, обеспечивая матрицу для продукции одноцепочечного антитела.

[0215] Для рекомбинантной продукции полинуклеотид, кодирующий антитело, вставляется в реплицируемый вектор для клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. Существует множество подходящих векторов для экспрессии рекомбинантного антитела. Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

[0216] Антитела к CLDN18.2 или их фрагменты также могут быть получены в виде слитых полипептидов, в которых антитело или фрагмент слиты с гетерологичным полипептидом, таким как сигнальная последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на аминоконце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность, как правило, является такой, которая распознается и процессируется (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальную последовательность антитела к CLDN18.2, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью. Сигнальная последовательность может представлять собой, например, щелочную фосфатазу, пенициллиназу, липопротеин, лидеры термостабильного энтеротоксина II и тому подобное. Для дрожжевой секреции нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, лидерной последовательностью, полученной из альфа-фактора дрожжевой

инвертазы (включая лидеры α-фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), кислой фосфатазы, глюкоамилазы *C. albicans*, или сигнал, описанный в WO90/13646. В клетках млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело к CLDN18.2.

[0217] Векторы экспрессии и клонирования содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Точку начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, точка начала репликации плазмиды 2-υ подходит для дрожжей, и различные вирусные источники (SV40, полиома, аденовирус, VSV и BPV) могут быть использованы для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент в виде точки начала репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (точка начала репликации SV40, как правило, может использоваться только потому, что он содержит ранний промотор).

[0218] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген, кодирующий селектируемый маркер для облегчения идентификации экспрессии. Типичные селектируемые маркерные гены кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, или, в качестве альтернативы, являются комплемент-ауксотрофными дефицитами, или, в других вариантах, поставляют специфические питательные вещества, которые не присутствуют в сложных средах, например, ген, кодирующий D-аланинрацемазу для Bacilli.

Иммунотерапия на основе антител

[0219] Целью иммунотерапии на основе антител с использованием антител, нацеленных на опухолевые антигены, является уничтожение раковых клеток без вреда для нормальной ткани. Поэтому эффективность и безопасность иммунотерапии на основе антител в онкологии в значительной степени зависит от предполагаемого механизма действия, соответствующей эффекторной функции иммунной системы и природы опухоль-ассоциированного антигена-мишени. Оптимальный антиген-мишень должен быть доступен и экспрессироваться гомогенно и исключительно на поверхности раковых клеток. Если предполагаемый механизм действия - антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) или комплементопосредованная цитотоксичность (КЗЦ), то для того, чтобы максимизировать взаимодействие области Fc антитела с компонентами системы комплемента или иммунными эффекторными клетками, комплекс антиген-абсорбент не должен быстро интернализоваться.

[0220] Важнейшей особенностью моноклональных антител является их высокая специфичность и способность либо непосредственно снижать пролиферацию и/или индуцировать апоптоз в опухолевых клетках-мишенях, либо помечать их для опосредованного иммунным эффектором уничтожения клеток (комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)) (Kubota, T. et al. (2009) Cancer Sci. 100 (9), 1566-1572). Конъюгация с цитотоксическими лекарственными препаратами может расширить применение моноклональных антител и улучшить их активность и эффективность (Goldmacher, V. S. et al. (2011) Ther. Deliv. 2 (3), 397-416; Sievers, E. L. (2013) Annu. Rev. Med. 64, 15-29).

[0221] Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) описывает способность

эффекторных клеток уничтожать клетки, для чего предпочтительно, чтобы клетка-мишень была помечена антителом. Эффекторные клетки могут включать В-клетки, Т-клетки, клетки-киллеры, NK-клетки, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, полиморфноядерные клетки, гранулоциты, тучные клетки и/или базофилы; более конкретно эффекторные клетки представляет собой Т-клетки или NK-клетки. В некоторых аспектах АЗКЦ происходит, когда антитела связываются с антигенами на опухолевых клетках, а домены Fc антител связываются с Fc-рецепторами (FcR) на поверхности иммунных эффекторных клеток. Было выявлено несколько семейств Fc-рецепторов, и определенные популяции клеток характерно экспрессируют определенные Fc-рецепторы. АЗКЦ можно рассматривать как механизм, позволяющий непосредственно вызывать различную степень немедленного разрушения опухоли, что приводит к презентации антигена и индукции Т-клеточных ответов, направленных против опухоли. Предпочтительно, чтобы индукция АЗКЦ in vivo приводила к Т-клеточным ответам, направленным против опухоли, и образованию антител, полученные от хозяина.

[0222] Более конкретно, существует шесть структурно различных типов человеческих Fcγ-рецепторов (FcγRI или CD64, FcγRIIa/CD32a, FcγRIIb/CD32b, FcγRIIc/CD32c, FcγRIIIa/CD16a и FcγRIIIb/CD16b), экспрессируемых на лейкоцитах как на миелоидной, так и лимфоидной линии дифференцировки. Fcγ-рецепторы делятся на два типа: активирующие рецепторы (CD64, CD32a, CD32c, CD16a и CD16b), которые приводят к активации иммунных клеток через иммунорецепторные тирозиновые мотивы активации (ИТАМ) на цитозольных хвостах или на молекулах корецепторов, и ингибирующий рецептор (CD32b), который передает сигналы через иммунорецепторные ингибирующие мотивы на основе тирозина (ИТИМ).

[0223] Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в FCGR2A (H131R) и FCGR3A (V158F) связаны с улучшенными результатами, связанными с более высокой аффинностью связывания антител с терапевтическими антителами IgG1 и IgG2 человека, что приводит к увеличению активности АЗКЦ (Vargas, F. A. et al, Cancer Cell 33: 649-663 (2018), Musolino, A. et al., J. Clin. Oncol. 26: 1789-1796 (2008), Zhang, W. et al, J. Clin. Oncol. 25:3712-3718 (2007), Nordstrom, J.L. et al, Breast Cancer Res. 13:R123 (2011)). Активирующий FcγR CD16A встречается в двух вариантах или аллелях с высокой (158V) или низкой (158F) аффинностью в отношении домена Fc IgG1. Большая часть (приблизительно 85%) популяции имеет генотип 158F либо в гомозиготной форме, либо в гетерозиготной с 158V. Таким образом, генотипы FcgR, наиболее часто ассоциирующиеся с более благоприятным ответом, встречаются у меньшей части популяции. Это дает веские основания для конструирования домена Fc терапевтических антител, разработанных для лечения рака, для лучшего взаимодействия с низкосвязывающими аллелями активирующих FcγR для экспансии, без учета генотипа FcγR, с целью разработки терапевтических средств, способных принести пользу большему проценту пациентов.

[0224] Критическим шагом в активации цитотоксических клеток является связывание мкАт с FcγRIIIa (CD16A) на иммунных эффекторных клетках, и сила этого взаимодействия определяется изотипом антитела, профилем гликозилирования области Fc антитела и полиморфизмами FcγRIIIa. В многочисленных публикациях сообщается о результатах, демонстрирующих роль FcγR-опосредованной эффекторной функции в противораковой терапии на основе антител, полученных в результате клинических исследований. Результаты исследования указывают на связь между клиническим ответом (например, эффективностью антител) и специфическими аллоформами активирующих человеческих FcγR. Сообщалось, что пациенты, являющиеся носителями аллеля 158F, демонстрируют сниженный клинический ответ на некоторые терапевтические антитела, включая трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб, инфликсимаб, ипилимумаб и другие терапевтические антитела, использующие АЗКЦ в качестве основного механизма действия.

Сообщалось, что антитела, сконструированные с улучшенным профилем связывания с FcgR, дают превосходный противоопухолевый ответ и обеспечивают большую клиническую пользу.

[0225] Открытие активирующих и ингибирующих FcγR привело к прикладным исследованиям, направленным на разработку терапевтических антител, которые «подходят по назначению», основываясь на активности связывания FcγR, характеризующейся соотношением активации и ингибирования (A:I), предназначенным для активации иммунных эффекторных клеток для выполнения определенных функций. Иммунотерапия рака с помощью моноклональных антител (мкАт) способствует уничтожению опухолевых клеток с помощью различных механизмов, включая активность АЗКЦ, АЗКФ и/или КЗЦ. На практике терапевтическая активность нескольких одобренных мкАт зависит от связывания областей Fcγ с низкоаффинными Fcγ-рецепторами, экспрессируемыми на эффекторных клетках.

[0226] В нескольких публикациях сообщается об успешном использовании стратегий белковой инженерии для конструирования вариантных доменов Fc человеческого IgG1 (областей CH) с оптимизированными профилями связывания FcgR и соотношениями активации/ингибирования (A: I), подходящими для оптимизации опосредованных клетками эффекторных функций. В частности, усилия были направлены на повышение аффинности домена Fc к низкоаффинному рецептору FcγIIIa. Был выявлен ряд мутаций в домене Fc, которые прямо или косвенно усиливают связывание Fc-рецепторов и, как следствие, значительно повышают клеточную цитотоксичность (Lazar, G.A. PNAS 103:4005-4010 (2006), Shields, R.L. et al, J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001) Stewart, R. et al., Protein Engineering Design and Selection 24: 671-678 (2011)). Исследователи из Genentech выявили мутации S239D/A330L/I332E, MedImmune – мутацию F243L (Stewart et al.), a Xencor – G236A (Richards, J.O. et al, Mol. Cancer Ther. 7:2517-2575 (2008)).

[0227] Несколько различных компаний, включая Xencor, Applied Molecular Evolution, Medimmune, Genentech и Macrogenics, описали варианты антител, включающие по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно области Fc дикого типа, причем область Fc варианта связывает FcγRIIIA и/или FcγRIIA с большой аффинностью по сравнению с аналогичной молекулой, содержащей область Fc дикого типа. Компания Xencor разработала технологию платформы Xmab и опубликовала результаты вариантов Fc IgG1, содержащих точечные мутации S239D/I332E, и S239D/A330L/I332E в качестве оптимизированных вариантов Fc с желаемыми соотношениями A: I. Компания Applied Molecular Evolution выявила варианты IgG, содержащие точечные мутации P247I и A339Q. Компания Macrogenics описала вариантные области Fc IgG1 человека, содержащие мутации в V305I, F243L, R292P, Y300L и P396L (вариант 18) (Stavenhagen, J.B. et al, Cancer Res. 67:8882-8990 (2007)) или L235V, F243L, R292P, Y300L, и P396L (Nordstrom, J.L. et al, Breast Cancer Res. 13:R123 (2011)).

[0228] Nordstrom и др. сообщили, что ответ на трастузумаб (HERCEPTIN™) при метастатическом раке молочной железы коррелирует с экспрессией высокосвязывающего варианта (158V) активирующего Fcγ-рецептора CD16A. Используя химерное моноклональное антитело к HER2 MGAH22 (со специфичностью и аффинностью, аналогичной трастузумабу), содержащее домен Fc IgG1 человека, модифицированный для усиленного связывания с обоими аллелями CD16A человека, Nordstrom продемонстрировал, что модифицированный домен Fc обеспечивает усиленную АЗКЦ против всех протестированных HER2-положительных опухолевых клеток, включая клетки, устойчивые к антипролиферативной активности трастузумаба или экспрессирующие низкий уровень HER2. Наибольшее улучшение происходит при использовании эффекторных клеток, выделенных от доноров, гомозиготных или гетерозиготных по CD16A-158F, низкосвязывающему аллелю.

[0229] Варианты Fc, включенные в MGHA22, были включены в клинический препарат-кандидат на основе

антитела маргетуксимаб, который был разработан таким образом, чтобы иметь повышенную способность связываться с активирующим Fcγ-рецептором (CD16A) и пониженную способность связываться с ингибирующим Fcγ-рецептором CD32B на иммунных эффекторных клетках. Компания Macrogenics недавно опубликовала предварительные данные первого рандомизированного исследования фазы 3, целью которого было изучить потенциальную пользу модификации Fc и роль генотипов Fc-гамма рецепторов на эффективность антител к HER2. Исследование SOPHIA (NCT02492711) представляет собой рандомизированное, открытое клиническое исследование фазы 3, оценивающее маргетуксимаб с химиотерапией по сравнению с трастузумабом с химиотерапией у пациентов с HER2-положительным метастатическим раком молочной железы. В ходе исследования была достигнута первая последовательная первичная конечная точка – выживаемость без прогрессирования (PFS). Медиана PFS у пациентов, получавших маргетуксимаб и химиотерапию, составила 5,8 месяцев по сравнению с 4,9 месяцами у пациентов, получавших трастузумаб и химиотерапию. На момент проведения первичного анализа PFS данные об общей выживаемости (OS), основанные на 158 событиях, были недостаточными. Медиана OS на тот момент была увеличена на 1,7 месяца у пациентов, получавших маргетуксимаб и химиотерапию, по сравнению с пациентами, получавшими трастузумаб и химиотерапию. В исследовательской подгруппе пациентов, несущих аллель CD16A 158F, медиана OS была увеличена на 6,8 месяцев в группе маргетуксимаба по сравнению с группой трастузумаба (пресс-релиз компании Macrogenics).

[0230] Стратегии гликоинженерии также использовали для разработки терапевтических антител с оптимизированными эффекторными функциями, предназначенными для лечения рака. Известно, что FcγR взаимодействуют с углеводами в домене CH2 и что состав этих гликанов оказывает существенное влияние на активность эффекторной функции. Высококонсервативный гликан в положении 297 в области Fc предполагает структурные изменения в области Fc, необходимые для связывания с Fcγ-рецептором. Незначительные различия в составе гликанов в этом сайте могут влиять на структуру Fc, а также могут изменять взаимодействие с FcγR путем прямого контакта. Возможно, лучшим примером этого являются нефукозилированные антитела, которые демонстрируют повышенное связывание с CD16A и значительно усиливают активность АЗКЦ (Niwa, R et al, Clin. Cancer Res. 10:6248-6255 (2004), Ferrara, C. et al, J. Biol. Chem 281:5032-5036 (2006)).

[0231] Эффективность терапевтических антител в решающей степени зависит от соответствующих посттрансляционных модификаций. В частности, гликозилирование Fc антитела необходимо для опосредованной Fc-рецептором активности. Среди эффекторных функций терапевтических антител, АЗКЦ была определена клинически как важный механизм противораковых антител. В данной области техники хорошо известно, что отсутствие коровой фукозы IgG-Fc значительно увеличивает связывание с FcγRIIa (CD16a) и приводит к повышению эффективности АЗКЦ (например, снижению EC50), что было успешно использовано для повышения эффективности терапевтических антител. Стратегии гликоинженерии включают получение антител в условиях, обеспечивающих низкое или полное отсутствие фукозилирования (например, нефукозилированное мкАт), чтобы повысить АЗКЦ за счет увеличения связывания FcGRIIIa.

[0232] Специалисты в данной области техники знают, что BioWa/Kyowa Hakko Kirin и GlycArt/Roche разработали запатентованные линии клеток, которые дают дефукозилированные антитела. Для достижения этого результата компания BioWa/Kyowa Kirin Hakko создала нокаутированную по ферменту α-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) линию клеток яичника китайского хомячка (технология POTELLIGENT ®), а компания GlycArt/Roche выбрала сверхэкспрессию гетерологичной β-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III в клетках, продуцирующих антитела (технология GlycoMab™, патент

США № 6602684).

[0233] Гликомодифицированные антитела с улучшенной активностью АЗКЦ были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) и в настоящее время продаются в США, включая могамулизумаб (POTELIGEO™), обинутузумаб (GAZYVA™) и бенрализумаб (FASENRA™). Могамулизумаб представляет собой афукозилированное антитело к CCR4, которое продуцируется в линии клеток с мутацией в гене FUT8 (a-1,6-фукозилтрансфераза) с использованием технологической платформы POTELLIGENT™, разработанной Biowa. У млекопитающих основная часть корового фукозилирования на N-гликанах происходит за счет α-1,6-связи. FUT8 является единственной α-1,6-фукозилтрансферазой, которая катализирует перенос остатков фукозы с GDP-фукозы на самый внутренний GlcNAc триманнозильной коровой структуры через α-1,6 связь. Бенрализумаб представляет собой антитело к рецептору ИЛ-5, которое также производится с использованием технологической платформы POTELLIGENT™ и, как сообщается, способно вызывать >1000-кратное усиление антителозависимой клеточно-опосредованной АЗКЦ (Pelaia, C et al, BioMed Research Int., Article ID 4839230 (2018).

[0234] Обинутузумаб представляет собой мкАт к CD20 II типа, характеризующийся низким содержанием фукозы вследствие добавления гена B-1,4-N-ацетилглюкозаминил-трансферазы (GnIII) в линию клеток-продуцентов (технология Glycart GLYCOMAB™). Модификация имеет эффект добавления разделяющего пополам N-ацетилглюкозамина (GlcNac) к структурам N-гликанов, присутствие которых препятствует фукозилированию, что приводит к образованию высокообогащенных, разделенных на две части нефукозилированных гликозилированных вариантов. Стратегия гликоинженерии, использованная для производства обинутузумаба, обеспечивает уникальный механизм действия, основанный на усилении АЗКЦ и АЗКФ, с меньшей зависимостью от основного механизма действия, используемого для двух других антител к CD20 (ритуксимаб и офатумумаб), производство которых в основном полагается на КЗЦ (Tobinai, K et al, Adv. Ther. 34(2): 324-356 (2017)). Специалист в данной области техники также понимает, что можно получать антитела с низким содержанием фукозы, используя субстрат-приманку гликозилтрансфераз, например, 2-дезокси-2-фтор-l-фукозу (2FF,) или ингибитор фукозилтрансфераз, например, 2F-перацетил-фукозу, чтобы вызвать уменьшение включения фукозы в гликаны антител, экспрессируемых в клетках млекопитающих (Dekkers, G, et al, Scientific Reports 6, номер публикации 36964 (2016)). Сообщается, что антитела, полученные с использованием ингибитора фукозилтрансферазы, показали значительное снижение относительного процента фукозилированных молекул гликанов (G0f, G1f и G2f) и что процент фукозилирования может быть снижен с 86% до 19% в присутствии ингибитора (Ho, D. et al. Fucosylation of a Therapeutic Antibody: Effects on Antibody-dependent Cell-mediated cytotoxicity (ADCC) Potency and Efficacy, Bioprocess International, April 12, 2016).

[0235] Комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ) представляет собой еще один способ уничтожения клеток, который может направляться с помощью антител. IgM является наиболее эффективным изотипом для активации комплемента, но IgG1 и IgG3 также очень эффективны для направления КЗЦ по классическому пути активации комплемента.

[0236] В некоторых аспектах антитела, описанные в данном документе, используются в комбинации с терапевтическим соединением или агентом, таким как цитотоксин, лекарственное средство или радиоизотоп, или конъюгированы с ними. В определенных аспектах антитело, описанное в данном документе, используется в комбинации с химиотерапевтическим агентом. В определенных аспектах конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) включает антитело, описанное в данном документе, конъюгированное (например, ковалентно присоединенное) с терапевтическим соединением или агентом.

[0237] Примеры терапевтических агентов, которые могут быть использованы в конъюгации с антителами, включают антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбурин, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, диброманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин). В определенных аспектах терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент или радиотоксический агент. В другом аспекте терапевтический агент представляет собой фотосенсибилизирующий агент, подходящий для использования в фотодинамической терапии, такой как порфимер натрия. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой иммунодепрессант. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой ГМ-КСФ. В некоторых аспектах терапевтический агент представляет собой доксорубицин, цисплатин, блеомицин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид или рицин А.

[0238] Примеры цитотоксина или цитотоксического агента включают любой агент, который наносит вред и, в частности, уничтожает клетки, например, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги или гомологи.

[0239] В некоторых аспектах антитело, описанное в данном документе, может быть конъюгировано с радиоизотопом, таким как йод-131, иттрий-90 или индий-111, для получения цитотоксичных радиофармацевтических препаратов для лечения заболевания, связанного с CLD18, например, рака.

[0240] Методы конъюгирования терапевтического соединения с антителами хорошо известны специалистам в данной области техники, см., например, Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

[0241] В некоторых вариантах осуществления КАЛС предназначены для уничтожения раковых клеток зависимым от мишени образом. Первым шагом в этом процессе является связывание антитела с антигеном. После связывания ADC весь комплекс антиген-КАЛС интернализируется, и цитотоксическая полезная нагрузка высвобождается в опухолевую клетку, что приводит к ее гибели. Факторы, влияющие на терапевтический индекс КАЛС, включают опухолевую специфичность антитела-мишени, уровень экспрессии опухолевого антигена-мишени, цитотоксическое лекарственное средство и линкер (Panowksi, S. et al. (2014) MAbs 6 (1), 34-45). Если предполагаемый механизм действия терапевтического антитела заключается в снижении уровня опухоль-ассоциированного антигена, или если антитело является КАЛС, предназначенным для доставки токсина в раковую клетку, то интернализация является желательной характеристикой антитела, используемого для доставки токсичной полезной нагрузки в опухолевую клетку-мишень.

[0242] В некоторых аспектах КАЛС включает любой агент, оказывающий терапевтическое действие на раковые клетки, и антитело к CLDN18.2 или его производное, как описано в данном документе. Конъюгация лекарственного средства не изменяет или существенно изменяет характеристики связывания, в частности, специфичность антитела. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой цитотоксический или цитостатический агент (например, любой агент, который губительно действует на раковые клетки и/или уничтожает их). Примеры классов таких цитотоксических агентов включают антитубулиновые агенты, вещества, связывающие малые бороздки ДНК (например, ендиины и лекситропсины), ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, сенсибилизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, нитрозомочевины, платинолы, соединения для таблетирования, пуриновые антиметаболиты, стероидные сенсибилизаторы, радиационные сенсибилизаторы таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и т.п. Дополнительные примеры таких цитотоксических агентов описаны в публикации США № 2018/0117174.

[0243] Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство может быть осуществлено любым способом, известным специалисту в данной области техники.Конъюгаты антитело-лекарственное средство могут быть получены путем связывания лекарственного средства с антителом в соответствии с обычной методикой. Антитело и лекарственное средство могут быть непосредственно связаны друг с другом через собственные линкерные группы или опосредованно через линкер или другую субстанцию. Примеры линкеров, которые могут быть использованы при получении КАЛС, описаны в публикации США № 2018/0117174.

[0244] Одним из примеров антител к CLDN18.2, используемого в иммунотерапии, является iMAb362, химерное IgG1 моноклональное антитело, специфичное к эпитопу в первом внеклеточном домене CLDN18.2. iMAb362, его мышиное исходное антитело и другие специфические антитела к CLDN18 раскрыты в патентах и патентных заявках, относящихся к семействам патентов WO2007/059997, WO2014/075788 и WO2016/166122.

[0245] Доклинически было показано, что iMAb362 ингибирует рост опухоли и уничтожает раковые клетки при помощи как непрямого (комплементзависимая цитотоксичность, антителозависимая клеточная цитотоксичность), так и прямого (антипролиферативный и проапоптотический эффекты) механизмов действия. Компания Astellas Pharma опубликовала отчеты, свидетельствующие о том, что доклиническая оценка характеристик конъюгата антитело-лекарственное средство iMAb362 (КАЛС), содержащего антимитотическое лекарственное средство монометил ауристатин E с линкером валин-цитруллин (iMAb-vcMMAE), продолжается (Kreuzberg, M et al, Annals of Oncology 28(5) v122-v141, статья 377P, WO2016/165762).

[0246] В исследование фазы IIb FAST были включены пациенты с прогрессирующей или рецидивирующей аденокарциномой желудка или пищеводно-желудочного перехода (NCT01630083). Согласно критериям приемлемости включения в исследование необходимо, чтобы у пациентов были CLDN18.2-положительные опухоли (т.е. интенсивность $2^+/3^+$ в $\geq$ 40% опухолевых клеток по данным иммуногистохимии). В ходе исследования оценивали роль iMAb362 в комбинации с химиотерапией в сравнении с химиотерапией первой линии. Согласно окончательным результатам, добавление антитела iMAB362 к химиотерапии (EOX, эпирубицин, оксалиплатин и капецитабин) увеличивало среднюю общую выживаемость на пять месяцев (8,4 против 13,2 месяцев, P = 0,0001) у пациентов с прогрессирующей аденокарциномой желудка, пищевода или

пищеводно-желудочного перехода (Schuler, M et al., Annals of Oncology, 27 (6): vi207-vi242, статья 614O (2016)). Комбинированная терапия также значительно улучшила выживаемость без прогрессирования и частоту ответов. Отчеты демонстрируют, что, когда результаты стратифицированы по уровням экспрессии CLDN18.2, наилучшие результаты наблюдали среди лиц с высоким уровнем экспрессии (интенсивность $\geq 2^+$ у $\geq$70%), чья средняя общая выживаемость составила 9,0 месяцев по сравнению с 16,7 месяцами, P <0,0005). Результаты подтверждают, что добавление антитела к CLDN18.2 к химиотерапии первой линии дает клинически значимый эффект у пациентов с прогрессирующим/рецидивирующим раком желудка.

Композиции и способы лечения

[0247] В изобретении также представлены композиции, включая, например, фармацевтические композиции, содержащие антитело к CLDN18.2 или его фрагмент. Такие композиции имеют множество терапевтических применений для лечения заболеваний или расстройств (например, заболеваний или расстройств, связанных с клетками, экспрессирующими CLDN18.2). В некоторых аспектах описанные в данном документе композиции вводят пациентам, например, in vivo, для лечения или предотвращения заболевания, связанного с нарушением регуляции экспрессии CLDN18.2. Предпочтительные пациенты включают пациентов-людей, страдающих первичным или метастатическим раком, происходящим из эпителиальных клеток.

[0248] Антитела можно вводить как отдельно, так и в комбинации с другими композициями, пригодными для лечения иммуноопосредованного воспалительного расстройства или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции, включая, например, фармацевтические композиции, содержащие антитело к CLDN18.2, могут дополнительно содержать терапевтический агент, конъюгированный или неконъюгированный с антителом к CLDN18.2 или фрагментом антитела.

[0249] В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую одно или более антител по настоящему изобретению.Фармацевтические композиции могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, а также с любыми другими известными адъювантами и эксципиентами в соответствии с общепринятыми методами, такими как те, что описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1995. В некоторых аспектах фармацевтическую композицию вводят субъекту для лечения рака.

[0250] В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, биспецифическая и полиспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение

[0251] В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, то есть антитело, биспецифическая и полиспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных

условий, которые могут инактивировать соединение.

[0252] Как правило, композиции для введения путем инъекции представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости фармацевтический препарат может также включать солюбилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты в стандартную лекарственную форму вводятся по отдельности или смешанными вместе, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. Когда предполагается введение фармацевтического препарата путем инфузии, ее можно наливать в бутылку для инфузий, содержащую воду или солевой раствор фармацевтического качества. Когда фармацевтический препарат вводят путем инъекции, то может прилагаться ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

[0253] Композицию по настоящему изобретению можно вводить множеством способов, известных в данной области техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Активные соединения можно готовить с носителями, которые будут обеспечивать защиту соединения от быстрого высвобождения, такими как составы для контролируемого высвобождения, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Множество способов получения таких составов хорошо известны специалисту в данной области техники. Смотри, например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0254] Уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного субъекта, композиции и способа введения, без токсического эффекта для субъекта. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от многих фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций согласно настоящему изобретению, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного применяемого соединения, длительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, массы, патологического состояния, общего состояния здоровья и анамнеза подлежащего лечению пациента и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

[0255] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть назначены в эффективных количествах. «Эффективное количество» относится к количеству, которое обеспечивает желаемую реакцию или желаемого эффекта отдельно или вместе с другими дозами. В случае лечения конкретного заболевания или конкретного патологического состояния, желаемая реакция предпочтительно связана с угнетением течения заболевания. Она включает замедление прогрессирования заболевания и, в частности, прерывание или реверсию прогрессирования заболевания.

[0256] В некоторых аспектах лечение рака представляет собой область, в которой особенно желательны комбинированные стратегии, поскольку часто комбинированное действие двух, трех, четырех или даже более противоопухолевых лекарственных средств / методов лечения дает синергетические эффекты, которые значительно сильнее, чем влияние монотерапевтического подхода. Агенты и композиции (например, фармацевтические композиции), представленные в данном документе, могут использоваться отдельно или в комбинации с традиционными схемами лечения, такими как хирургия, облучение, химиотерапия и/или

трансплантация костного мозга (аутологичная, сингенная, аллогенная или неродственная). Агенты и композиции также могут использоваться в комбинации с одним или более из цитокинов, хемокинов, костимулирующих молекул или слитых белков, бактериальных средств для лечения, ингибиторов киназ, толл-подобных рецепторов, ингибиторов ангиогенеза, низкомолекулярных препаратов для таргетной терапии, вирусных вакцин, мультиэпитопных стратегий, адоптивного переноса Т-клеток и таргетных терапий на основе пептидов. См. патент США № 10093736. Таким образом, в еще одном варианте осуществления настоящего изобретения средство для лечения рака можно эффективно комбинировать с различными другими лекарственными средствами.

[0257] В некоторых аспектах описанные в данном документе агенты и композиции вводят пациентам, например, *in vivo*, для лечения или предотвращения множества расстройств, таких как те, что описаны в данном документе. Предпочтительные пациенты включают пациентов-людей, страдающих расстройствами, которые можно исправить или облегчить путем введения агентов и композиций, описанных в данном документе. Сюда входят заболевания, связанные с клетками, характеризующимися дисрегуляцией экспрессии CLDN18.2.

[0258] Например, в одном варианте осуществления агенты и композиции, описанные в данном документе, могут быть использованы для лечения пациента с онкологическим заболеванием, например, с онкологическим заболеванием, таким как то, что описано в данном документе, которое характеризуется наличием раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2. В некоторых аспектах онкологическое заболевание представляет собой рак желудка, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак яичников, рак толстой кишки, рак печени, рак головы и шеи, рак желчного пузыря или их метастазы.

[0259] В одном из вариантов осуществления представленного способа лечения субъекту, нуждающемуся в терапии, также вводят терапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из противоопухолевого агента, химиотерапевтического агента, агента, ингибирующего рост, цитотоксического агента и ингибитора иммунных контрольных точек.

[0260] В одном из вариантов осуществления представленных способов лечения антитело, фрагмент антитела или биспецифическое антитело, содержащее анти-CLDN18.2 связывающий агент по настоящему изобретению, совместно вводят с химиотерапевтическим агентом, который может быть цитотоксическим агентом. Например, эпитубицин, оксалиплатин и/или 5-ФУ можно вводить пациентам, получающим терапию против клаудина 18.2.

[0261] Рассмотренные в данном документе комбинации терапевтических агентов можно вводить одновременно в виде компонентов биспецифического или полиспецифического связывающего агента или слитого белка или в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе. Альтернативно, комбинацию терапевтических средств можно вводить одновременно в виде отдельных композиций с каждым агентом в фармацевтически приемлемом носителе. В еще одном варианте осуществления комбинацию терапевтических агентов можно вводить последовательно.

[0262] В одном варианте осуществления способ лечения по изобретению дополнительно включает введение агента, способного стабилизировать или увеличивать экспрессию клаудина 18.2 на клеточной поверхности раковой клетки. Например, агент, стабилизирующий или увеличивающий экспрессию клаудина 18.2, может представлять собой оксалиплатин и/или 5-ФУ.

[0263] В некоторых аспектах можно использовать обычные способы переноса генов на вирусной и невирусной основе для введения нуклеиновых кислот, кодирующих антитела или их производные, как

описано в данном документе, в клетки млекопитающих или ткани-мишени. Такие способы можно использовать для введения нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, в клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их производные, вводят для применения в генной терапии *in vivo* или *ex vivo*. В других вариантах осуществления способы доставки генов используются для изучения активности антител в клеточных или животных моделях. Системы доставки с невирусными векторами включают плазмиды ДНК, оголенную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома. Системы доставки с вирусными векторами включают ДНК и РНК вирусов, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы. Такие способы хорошо известны в данной области техники.

[0264] Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные полипептиды по настоящему изобретению, включают липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или липид: конъюгаты нуклеиновых кислот, голую ДНК, искусственные вирионы и усиленный агентом захват ДНК. Способы липофекции и реагенты для липофекции хорошо известны в данной области техники (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, которые являются пригодными для эффективной липофекции полинуклеотидов с распознаванием рецепторов, включают липиды из Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (введение *ex vivo*) или в ткани-мишени (введение *in vivo*). Получение липида: комплексы нуклеиновых кислот, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известны специалистам в данной области техники.

[0265] Применение систем на основе вирусной РНК или ДНК для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, описанные в данном документе, позволяет использовать преимущества высотехнологичных процессов для нацеливания вируса на определенные клетки в организме и доставки вирусной полезной нагрузки в ядро. Вирусные векторы можно вводить непосредственно пациентам (*in vivo*) или их можно применять для обработки клеток *in vitro*, при этом модифицированные клетки вводят пациентам (*ex vivo*). Обычные вирусные системы для доставки полипептидов согласно настоящему изобретению могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса для переноса генов. Вирусные векторы в настоящее время являются наиболее эффективным и универсальным способом переноса генов в клетки и ткани-мишени. Интеграция в геном хозяина возможна с помощью способов переноса генов ретровируса, лентивируса и аденоассоциированного вируса, что часто приводит к долговременной экспрессии встроенного трансгена. Кроме того, высокая эффективность трансдукции наблюдалась во многих различных типах клеток и целевых тканях.

[0266] Все указанные патенты и публикации специально включены в данный документ посредством ссылки с целью описания и изобретения, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с изобретением. Эти публикации представлены исключительно с целью их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не следует интерпретировать как признание того, что изобретатели не имеют права датировать такое описание более ранним числом в силу более раннего изобретения или по любой другой причине. Все заявления относительно даты или представления содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не представляют собой какого-либо признания в отношении правильности дат или содержания этих документов.

[0267] В той степени, в которой это уже не указано, специалистам в данной области техники будет понятно, что любой из различных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, может быть дополнительно модифицирован для включения функций, показанных в любом из других

вариантов осуществления, раскрытых в данном документе.

[0268] Широкий объем этого изобретения лучше всего можно понять со ссылкой на следующие примеры, которые не предназначены для ограничения изобретения конкретными вариантами осуществления. Описанные в данном документе конкретные варианты осуществления предлагаются только в качестве примера, а изобретение должно быть ограничено условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

ПРИМЕРЫ

Общие способы

[0269] Описаны методы очистки белков, включая иммунопреципитацию, хроматографию и электрофорез. Coligan et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. Описаны химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков и гликозилирование белков. См., например, Coligan et al. (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, N.Y., pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, Mo.; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384-391. Описано получение, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител. Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Harlow and Lane, выше.

[0270] Супернатант гибридомы был очищен с помощью колонки HiTrap protein G (GE, кат. № 17040401) в соответствии с процедурами производителя. Вкратце, супернатант гибридомы уравновешивали DPBS (Gibco, кат. № 14190-136) 5 CV и загружали с помощью шприца/инфузионного насоса (Legato 200, KDS) при температуре окружающей среды и времени удерживания 3 минуты. Колонку промывали 5 CV DPBS и элюировали 4 CV буфера для элюирования при pH 2,8 (Fisher Scientific, кат. № PI21004). Элюат фракционировали, и фракции нейтрализовали 1M Трис-HCL, pH 8,5 (Fisher Scientific, кат. №. 50-843-270) и анализировали с помощью A280 (DropSense96, Trinean). Пиковые фракции объединяли и буфер меняли на DPBS. Центрифужные фильтры (EMD Millipore, кат. № UFC803024) уравновешивали в DPBS при 4 000 x g в течение 2 мин. Очищенный образец загружали, добавляли DPBS и образец вращали при 4 000 x g в течение 5 – 10 минут, пока общий объем DPBS не достигнет ≥ 6 DV. Окончательный пул был проанализирован при A280.

[0271] Описаны стандартные методы молекулярной биологии. Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, Calif. Стандартные способы также представлены в Ausbel et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y., в которой описывается клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

[0272] Стабильные линии клеток, экспрессирующие CLDN18.2 или CLDN18.1, были получены путем трансфекции выбранной клетки-хозяина (т.е. клеток CHO-K1, NIH/3T3 или HEK293, все приобретены в ATCC) плазмидами на основе pcDNA3.1, экспрессирующими клаудин 18 Homo sapiens, вариант транскрипта 2 (CLDN18.2), или клаудин 18 Homo sapiens, вариант транскрипта 1 (CLDN18.1) с использованием липидной трансфекции с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen, кат. № L3000015).

[0273] Экспрессию подтверждали с помощью соответствующих антител через 24 ч и 48 ч после трансфекции с использованием проточной цитометрии для анализа поверхностной экспрессии. Для отбора интегрированных клеток использовали селекцию антибиотиками, после 7-10 дней селекции генетицином проводили предельное разведение выживших клеток в 96-луночном планшете, при этом трансфектанты находились под селекционным давлением (генетицин).

[0274] Через 10-14 дней отдельные колонии отбирали для скрининга с помощью проточной цитометрии с антителами, специфичными к CLDN18.2 или CLDN18.1 (CLDN18.2 - полученная самостоятельно версия антитела положительного контроля, синтезированного с использованием общедоступной информации о последовательности моноклонального антитела, о котором сообщалось в US 2018/0117174 как о специфичном в отношении CLDN18.2 (и неспецифичном для CLDN18.1) (упоминается в данном документе как антитело «положительного контроля»); поликлональное антитело к клаудину 18, CLDN18.1, (Invitrogen, кат. № 38-8000)). 3-5 клонов с самой высокой экспрессией отбирали для дальнейшей разработки. После нескольких пассажей уровень экспрессии был подтвержден при помощи проточной цитометрии и анализа методом визуализации, чтобы убедиться в ее стабильности. Специфическая экспрессия генов также была подтверждена с помощью ПЦР.

[0275] Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи для клонов гибридомы были определены, как описано ниже. Общую РНК выделяли из 1-2x10^6 гибридомных клеток с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit от Qiagen (Germantown, MD, USA). кДНК генерировали путем проведения реакций 5' RACE с использованием набора SMARTer RACE 5'/3' Kit от Takara (Маунтин-Вью, штат Калифорния, США). ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Q5 High-Fidelity от NEB (Ипсвич, штат Массачусетс, США) для амплификации вариабельных областей тяжелой и легкой цепей с использованием смеси универсальных праймеров Takara в сочетании с ген-специфическими праймерами для мышиной 3' константной области соответствующего иммуноглобулина. Амплифицированные вариабельные области для тяжелой и легкой цепей проводили на 2% агарозном геле, вырезали соответствующие полосы и затем очищали гель с помощью набора Mini Elute Gel Extraction Kit от Qiagen. Очищенные ПЦР-продукты клонировали с помощью набора Zero Blunt PCR Cloning Kit от Invitrogen (Карлсбад, штат Калифорния, США), трансформировали в компетентные клетки E. coli Stellar от Takara и высевали на планшеты с LB-агаром + 50 мкг/мл канамицина. Прямое секвенирование колоний по Сэнгеру выполняли в компании GeneWiz (Саут-Плейнфилд, штат Нью-Джерси, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью IMGT V-QUEST для выявления продуктивных реаранжировок и анализа транслированных белковых последовательностей. Определение CDR было основано на нумерации IMGT.

[0276] Существуют методы проточной цитометрии, включая системы обнаружения путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS®). См., например, Owens et al. (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J.; Givan (2001) Flow Cytometry, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, N.J.; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J. Существуют флуоресцентные реагенты, пригодные для модификации нуклеиновых кислот, включая праймеры и зонды нуклеиновых кислот, полипептиды и антитела, для применения, например, в качестве диагностических реагентов. Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, Mo.

[0277] Полученное самостоятельно CLDN18.2-специфическое антитело золбетуксимаб положительного контроля (ранее обозначаемое как клаудиксимаб), упоминаемое в данном документе как «PC1», был изготовлено компанией CRO на основе общедоступной информации об их последовательностях VH и VL

(последовательность VH: SEQ ID NO: 32 из US 2018/0117174; последовательность VL: SEQ ID NO: 39 из US 2018/0117174). Антитело PC1 было использовано для подтверждения экспрессии CLDN18.2 трансфектантами и линиями опухолевых клеток, используемыми в примерах, а также для создания анализов связывания и функциональных анализов, используемых для оценки и характеристики специфических антител к CLDN18.2, описанных в данном документе.

[0278] Вкратце, плазмиды, содержащие последовательности контрольных и эталонных антител, трансфицировали с помощью ExpiCHO™ Expression System (каталожный номер: A29133, ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали при 37 °C и 8% CO_2 в течение 1 дня, а затем при 32 °C и 5% CO_2 после трансфекции в среде, входящей набор. Антитела очищали путем осветления культуральной среды ExpiCHO™ при помощи центрифугирования при 1000g в течение 10 мин, а затем при 5000g в течение 30 мин. Затем супернатант фильтровали с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм, а затем фильтра с размером пор 0,22 мкм. Затем супернатант подвергали аффинной очистке с использованием смол с белком A/G (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния; кат. № 20424) в соответствии с протоколом производителя. Перед очисткой при помощи ИФА титр антител в культуральной среде был приблизительно определен, чтобы гарантировать, что количество загруженной среды заняло менее 80% связывающей способности смолы. После инкубации смолы промывали PBS и элюировали буфером для элюирования (Life Technologies, кат. № 21004). Элюированные фракции немедленно доводили до физиологического pH путем добавления буфера Трис, pH 8,0. Для очищенных антител впоследствии проводили замену буфера, и концентрировали белок с использованием центрифужного фильтра Amicon Ultra-15 (Life Technologies, кат. № UFC900324) в буфере PBS. Концентрацию антител определяли при помощи анализа белка с использованием BCA. Для проверки чистоты антител были проведен ДСН-ПААГ-электрофорез и окрашивание по Кумасси. Очищенный белок разделяли на аликвоты и хранили при -80 °C для длительного хранения или при 4 °C для немедленного использования.

[0279] Целостность антитела была подтверждена с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза с последующим окрашиванием по Кумасси в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, в невосстанавливающих условиях отмечали одну доминирующая полоса около 150 кДа, тогда как в восстанавливающих условиях отмечали две полосы, 50 кДа и 25 кДа.

[0280] Существуют стандартные методы определения взаимодействия лиганда и рецептора. *См., например,* Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York. Стандартные методы функциональной характеристики антител, подходящие для определения характеристик антител с конкретными механизмами действия, также хорошо известны специалистам в данной области техники.

[0281] Существуют программные пакеты и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, фолдинга белка, функциональных доменов, аннотации CDR, сайтов гликозилирования и выравнивания последовательностей.

Пример 1. Получение антител к CLDN18.2

[0282] Мышиные антитела к клаудину 18.2 получали путем иммунизации мышей Balb/c клетками HEK293, трансфицированными геном клаудина 18.2 человека.

[0283] Человеческие антитела к клаудину 18.2 получали путем иммунизации трансгенных в отношении человеческого Ig мышей, мышей линии Trianni (WO2013/063391) с клетками HEK293, трансфицированными геном клаудина 18.2 человека.

[0284] Мышей (Balb/c или трансгенных по человеческому Ig) иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) или

подкожно (п/к). Иммунный ответ отслеживали путем взятия проб крови из ретроорбитального синуса. Плазму проверяли методом проточной цитометрии или визуализации (как описано ниже), и мышей с достаточным титром антител к клаудину 18.2 использовали для слияния. Мышам вводили иммуногены внутрибрюшинно или внутривенно перед умерщвлением и удалением селезенки и лимфатических узлов.

[0285] Для отбора мышей Balb/c или трансгенных по Ig человека мышей, продуцирующих антитела, связывающие клаудин 18.2, сыворотки иммунизированных мышей подвергали скринингу методом проточной цитометрии (FACS) на связывание с линией клеток, экспрессирующей клаудин 18.2 (линии клеток CHO, HEK293 или 3T3-Клаудин 18.2), а не с контрольной линией клеток, которая не экспрессирует клаудин 18.2. Вкратце, Клаудин 18.2-CHO (клетки HEK или 3T3) инкубировали с разведениями сыворотки от иммунизированных мышей. Клетки промывали, и специфическое связывание антител определяли с помощью меченного PE Ат к IgG мыши. Анализ методом проточной цитометрии проводили на проточном цитометре (Intellicyte, IQue plus, Sartorius). Кроме того, сыворотку мышей исследовали методом визуализации. Вкратце, Клаудин 18.2-Cho (клетки HEK или 3T3) инкубировали с разведениями сыворотки от иммунизированных мышей. Клетки промывали, фиксировали параформальдегидом, промывали, определяли связывание антител с помощью конъюгированных с Alexa488 вторичных козьих антимышиных антител и Hoechst (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). Планшеты сканировали и анализировали на аппарате для визуализации (Cytation 5, Biotek, Уиниски, Вермонт). Супернатанты гибридомы проверяли на специфическое связывание антитела к клаудину 18.2 с помощью проточной цитометрии и визуализации, как описано выше.

[0286] Для получения гибридом, продуцирующих человеческие и мышиные антитела по изобретению, спленоциты и клетки лимфатического узла выделяли из иммунизированных мышей и сливали с соответствующей линией иммортализованных клеток, такой как линия клеток миеломы мыши. Полученные гибридомы были подвергнуты скринингу на продукцию антигенспецифических антител. Например, суспензии из отдельных спленоцитов, клеток лимфатических узлов иммунизированных мышей сливали с равным количеством несекретирующих IgG клеток миеломы мыши Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) методом электрослияния. Клетки высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты для культуры тканей, затем 2 недели инкубировали в среде для селекции (среда HAT), после чего переводили в среду для гибридомной культуры. Примерно через 10-14 дней после посева клеток супернатанты из отдельных лунок подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии или визуализации, как описано выше. Секретирующие антитела гибридомы переносили в 24-луночные планшеты, проводили повторный скрининг, и если они все еще были положительными в отношении антитела к клаудину 18.2, положительные гибридомы субклонировали путем предельного разведения или сортировки с помощью сортера отдельных клеток. Затем стабильные субклоны культивировали *in vitro* для получения небольшого количества антител, которые использовали для очистки и определения характеристик.

Пример 2. Специфичность антител к клаудину 18.2

[0287] Специфичность связывания антител к клаудину оценивали с помощью анализа методом иммунофлуоресцентной визуализации.

[0288] Специфическую клеточную аффинность связывания антител к клаудину 18.2 антител тестировали на клетках CHO-CLDN18.2 (трансфицированные клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантный человеческий CLDN18.2) и CHO-CLDN18.1 (трансфицированные клетки CHO, экспрессирующие рекомбинантный человеческий CLDN18.1). Клетки помещали в полную среду, содержащую F12 с 10% FBS, затем инкубировали в течение ночи при 37°C, антитела к клаудину 18.2 серийно разводили и добавляли в планшеты для анализа, инкубировали при 4°C в течение 2 часов, затем фиксировали клетки и далее окрашивали клетки

в течение 30 минут конъюгированнным с Alexa Fluor® 488 козьим вторичным антителом к IgG человека (H+L), Invitrogen, кат.№ A-11013, для обнаружения. Связывание оценивали путем визуализации клеток и количественного определения интенсивности флуоресценции с помощью прибора Biotek Cytation.

[0289] Как показано на Фиг. 3A, группа очищенных мышиных антител к клаудину 18.2 связывается с клетками CHO-CLDN18.2, но не с клетками CHO-CLDN18.1 при использовании 10 мкг/мл антител в исследовании, на Фиг. 3B показаны репрезентативные данные дозозависимого связывания Ms-1, Ms-2 и Ms-3 с клетками CHO-CLDN18.2 со значениями EC50, равными 1,2 нМ, 2,8 нМ и 1,8 нМ, соответственно. Контрольное Ат PC1 имеет значение EC50, равное 3,2 нМ, что соответствует литературным данным. Антитело отрицательного контроля не связывается с клетками CHO-CLDN18.2.

[0290] Аффинность связывания антител перспективной панели была также проверена на линии клеток CHO CLDN18.1, стабильно экспрессирующей клаудин 18.1. Ни одно из антител не проявило активной связывающей активности при самой высокой тестируемой концентрации 133,4 нМ. Данные репрезентативных клонов показаны на Фиг. 3C. Оба клона Ms-4 и Hu-3 демонстрировали дозозависимое связывание с клетками CHO-CLDN18.2 со значениями EC50, равными 0,75 нМ и 1,34 нМ, в тоже время не связываясь с клетками CHO-CLDN18.1.

[0291] Полный набор данных дозозависимого связывания мышиного антитела к клаудину 18.2 перспективной панели обобщен в таблице 5. Группа очищенных мышиных антител к клаудину 18.2 связывается с клетками CHO-CLDN18.2 со значениями EC50 в диапазоне 0,8-3,3 нМ.

Таблица 5. Специфичность мышиных антител к CLDN18.2

мкАт	Связывание CHO-18.2, EC50, нМ	Связывание PATU8988S
Ms1	1,2	+++
Ms2	3,0	++
Ms3	1,8	+++
Ms4	0,8	++++
Ms5	1,7	+++
Ms6	1,2	+++
Ms7	1,4	+++
Ms8	1,5	+++
Ms9	1,5	+++
Ms10	1,3	+++
Ms11	3,3	++
Ms12	2,0	+++
Ms13	1,2	+++
Ms14	1,1	++
Ms15	1,8	+++
Ms16	0,8	++++
Ms17	1,4	+++
Ms18	1,3	+++
Ms19	2,3	+++
Ms20	1,3	+++

Ms21	1,5	+++
Ms22	2,6	+++

[0292] Аналогично, как показано на Фиг. 4A, репрезентативные очищенные человеческие антитела к клаудину 18.2 связываются с клетками CHO-CLDN18.2, но не с клетками CHO-CLDN18.1 при использовании 10 мкг/мл антител в исследовании.

[0293] Полный набор данных дозозависимого связывания перспективной панели человеческих антител к клаудину 18.2 представлен в таблице 6. Группа из 17 очищенных антител к клаудину 18.2 связывается с CHO CLDN18.2 со значениями EC50 в диапазоне от 0,77 нМ до 19 нМ. Репрезентативные данные клонирования показаны на Фиг. 4B. Клоны Hu-2, Hu-9 и Hu-10 показали EC50 связывания 1,5, 1,1 и 1,5 нМ.

Таблица 6. Специфичность человеческих антител к CLDN18.2

мкАт	Связывание CHO-18.2, EC50, нМ	Связывание PATU8988S
Hu-1	3,6	++
Hu-2	1,5	+++
Hu-3	1,3	+++
Hu-4	5,2	++
Hu-5	4,5	+
Hu-6	1,5	+++
Hu-7	1,0	++++
Hu-8	3,7	++
Hu-9	1,1	++++
Hu-10	1,5	++++
Hu-11	17	++
Hu-12	1,2	++++
Hu-13	5,6	++
Hu-14	19	+
Hu-16	12	+
Hu-17	6,2	+
Hu-18	0,8	+

Пример 3. Аффинность связывания антител к клаудину 18.2 с линиями опухолевых клеток, экспрессирующих клаудин 18.2

[0294] Плотность и статус гликозилирования белков-мишеней варьируются от типа к типу клеток. Аффинность связывания и активность зависимых от аффинности механизмов, таких как АЗКЦ и КЗЦ, существенно зависят от плотности мишени и статуса гликозилирования. Эффекты, определенные с использованием линий клеток, эндогенно экспрессирующих клаудин 18.2, имеют большее трансляционное значение для эффективности антител к клаудину 18.2.

[0295] Опухолевые клетки помещали в полную среду, содержащую RPMI1640 с +10% FBS, затем инкубировали в течение ночи при 37°C, антитела к клаудину 18.2 серийно разводили и добавляли в планшеты для анализа, инкубировали при 4°C в течение 2 часов, затем фиксировали клетки и далее окрашивали клетки в течение 30 минут конъюгированнным с Alexa Fluor® 488 вторичным козьим антителом к IgG человека (H+L), Invitrogen (кат. № A-11013) для обнаружения. Связывание оценивали путем визуализации клеток и

количественного определения интенсивности флуоресценции с помощью прибора Biotek Cytation.

[0296] Относительный уровень экспрессии различных типов клеток представлен на Фиг. 5. Оценка уровня экспрессии клаудина 18.2 в рекомбинантных клетках CHO-Клаудин 18.2, сконструированных для сверхэкспрессии клаудина 18.2 бок о бок с линией клеток опухоли желудка NUGC-4 и линией клеток опухоли поджелудочной железы PATU8988S, демонстрирует, что уровень экспрессии CHO-Клаудин 18.2 более чем в 100 раз превышает эндогенный уровень экспрессии клеток NUGC-4 и PATU8988S.

[0297] Описанные антитела к CLDN18.2 демонстрируют связывание с линией клеток опухоли поджелудочной железы PATU8988S (см. таблицы 5 и 6, выше) со значениями EC50 от менее 2 нМ до около 100 нМ. Сила связывания представлена в таблице 5 и таблице 6 в четырех категориях, самое сильное связывание со значениями EC50 менее 2нМ определено как «++++», значения связывания EC50 от 2нМ до 20нМ определены как «+++», значения связывания EC50 от 20нМ до 100нМ обозначены как «++», а EC50 для слабого связывания около 100 нМ обозначено как «+».

[0298] Как показано на Фиг. 6A и 6B, панели антител к клаудину 18.2 демонстрировали лучшую аффинность связывания с клетками PATU8988S по сравнению с полученным самостоятельно PC1 положительного контроля. Когда для окрашивания клеток использовали 20 мкг/мл антител, интенсивность флуоресценции для связывания PC1 значительно ниже интенсивности флуоресценции для антител Ms1-10 и Hu1-16.

[0299] Точно так же аффинность связывания антител Hu-2, Hu-9 и Hu-10 в панели человеческих антител демонстрирует лучшую аффинность связывания с линией клеток опухоли желудка человека NUGC-4, что показано репрезентативными данными на Фиг. 7.

[0300] Для дальнейшей оценки аффинности связывания Ат к клаудину 18.2 с опухолевыми клетками, другая линия клеток опухоли желудка человека, KATOIII, которая эндогенно экспрессирует клаудин 18.2, была использована в анализе связывания методом проточной цитометрии (Фиг. 8). Вкратце, клетки KatoIII помещали в полную среду, содержащую RPMI1640 с +10% FBS, антитела к клаудину 18.2 серийно разводили и добавляли в планшеты для анализа, инкубировали при 4°C в течение 2 часов, затем клетки фиксировали и далее окрашивали в течение 30 минут конъюгированнным с Alexa Fluor® 488 вторичным козьим антителом к IgG человека (H+L), Invitrogen (кат.№ A-11013) для обнаружения.

[0301] Связывание антител оценивали с помощью проточного цитометра IQUE plus (Sartorius, Геттинген, Германия). Как показано на Фиг. 8, когда для окрашивания клеток использовали 6,67 мкг/мл антител, интенсивность флуоресценции для связывания антитела PC1 собственной разработки iMAb362 значительно ниже, чем интенсивность флуоресценции антител Hu-2, Hu-9 и Hu-10.

Пример 4. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)

[0302] Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) антител к клаудину 18.2, связанных с положительными по клаудину 18.2 клетками, измеряли с помощью биолюминесцентного анализа для определения активности антител, которые специфически связывают и активируют мышиный FcγRIV. Клетки, стабильно экспрессирующие CLDN18.2, либо рекомбинантный белок, экспрессированный трансфицированными клетками CHO или линией клеток человека, экспрессирующей эндогенный CLDN18.2, либо отрицательные клетки, помещали в полную среду, содержащую F12 + 10%FBS, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем антитела к клаудину 18.2 разводили серийно и добавляли вместе с эффекторными клетками. Жизнеспособность клеток определяли с помощью биолюминесцентного анализа Promega в соответствии с инструкцией производителя (Promega, кат. № M1201).

[0303] Как показано в таблице 7, репрезентативные человеческие антитела к клаудину 18.2, которые имеют

человеческие вариабельные области с мышиным Fc IgG2a, индуцировали АЗКЦ со значениями EC50 от 0,77 нМ до 7,09 нМ. Репрезентативные данные показаны на Фиг. 9. Антитела Hu-2, Hu-7 и Hu-9 продемонстрировали EC50 для АЗКЦ, равную 3,51, 3,52 и 1,10 нМ. Неродственное мышиное антитело IgG2a, не специфичное в отношении CLDN18.2, не проявляет активности в анализе. Антитело PC1, созданное на основе человеческого Fc IgG1, имело EC50 0,66 нМ в аналогичном анализе при добавлении человеческих эффекторных клеток (данные не показаны).

Таблица 7. Активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ)

мкАт	EC50 CHO-18.2, нМ
Hu-1	0,77
Hu-2	3,51
Hu-3	3,11
Hu-4	2,39
Hu-5	7,09
Hu-6	4,80
Hu-7	3,52
Hu-8	1,42
Hu-9	1,10
Hu-10	1,25
Hu-11	1,51
Hu-12	2,26
Hu-13	1,17
Hu-14	1,51
Hu-16	3,09

Пример 5. Скрининг по эндоцитозу

[0304] Эндоцитоз описанных CLDN18.2-специфических антител, связанных с положительными по клаудину 18.2 клетками, измеряли с помощью анализа эндоцитоза на основе цитотоксичности, в котором использовали совместное введение связанного с мишенью антитела вместе с конъюгированным с MMAF антителом к Fc IgG человека.

[0305] Клетки, стабильно экспрессирующие клаудин 18.2, или отрицательные клетки помещали в полную среду, содержащую F12 +10% FBS, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. Затем антитела к Claudin18.2 разводили серийно и добавляли вместе с конъюгированным с MMAF антителом к Fc IgG человека в планшеты для анализа и инкубировали при 37°C в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток определяли с помощью биолюминесцентного анализа Promega Cell-titer Glo (Promega, кат. № 7570) в соответствии с инструкцией производителя.

[0306] Как показано в Таблице 8, перспективная панель очищенных антител к мышиному клаудину 18.2 индуцировала обусловленную эндоцитозом токсичность клеток CHO CLDN18.2 со значениями EC50 в диапазоне 0,71-2,55 нМ.

[0307] Аналогично, как показано в Таблице 9, панель Trianni очищенных человеческих антител к клаудину 18.2 индуцировала вызванную эндоцитозом клеточную токсичность в CHO CLDN18.2 со значениями EC50 в диапазоне 0,85–13,39 нМ. Репрезентативные данные клонирования показаны на Фиг. 10. Клоны Hu-2, Hu-7, Hu-9 и Hu-11 проявляли обусловленную эндоцитозом цитотоксичность с EC50 1,43, 1,65, 0,85 и 1,31 нМ,

соответственно.

[0308] Антитела перспективной панели также проявляли обусловленную эндоцитозом клеточную цитотоксичность в линии опухолевых клеток поджелудочной железы PATU8988S, которая эндогенно экспрессирует клаудин 18.2, но не проявляли обусловленной эндоцитозом активности уничтожения клеток в линии клеток CHO CLDN18.1, стабильно экспрессирующей клаудин 18.1 (данные не показаны).

Таблица 8. Эндоцитоз мышиных мкАт к клаудину 18.2

Название клона	CHO-18.2, EC50, нМ
Ms1	1,09
Ms2	2,55
Ms3	1,14
Ms4	0,98
Ms5	1,43
Ms6	1,26
Ms7	1,12
Ms8	1,08
Ms9	1,10
Ms10	0,96
Ms11	1,30
Ms12	1,07
Ms13	0,71
Ms14	1,02
Ms15	1,15
Ms16	1,00
Ms17	0,81
Ms18	1,39
Ms19	1,36
Ms20	1,07
Ms21	0,95
Ms22	1,61

Таблица 9. Эндоцитоз мкАт человека к клаудину 18.2

Название клона	CHO-18.2, EC50, нМ
Hu-1	1,61
Hu-2	1,43
Hu-3	1,23
Hu-4	1,55
Hu-5	13,39
Hu-6	1,69
Hu-7	1,65
Hu-8	1,00
Hu-9	0,85
Hu-10	0,85

Hu-11	1,31
Hu-12	2,01
Hu-13	2,16
Hu-14	1,51
Hu-16	3,09

Пример 6. Повышенная антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)

[0309] Активность АЗКЦ антител к клаудину 18.2, связанных с положительными по клаудину 18.2 клетками, измеряли с помощью биолюминесцентного анализа для определения активности антител, которые специфически связываются и активируют человеческий FcγRIIIa. Клетки CHO, стабильно экспрессирующие CLDN18.2, или отрицательные клетки, помещали в полную среду, содержащую F12 + 10% FBS, и клетки инкубировали в течение ночи при 37 °C. Затем антитела к клаудину 18.2 разводили серийно и добавляли вместе с эффекторными клетками. Жизнеспособность клеток определяли с помощью биолюминесцентного анализа Promega в соответствии с инструкцией производителя (Promega, кат. № 7010).

[0310] Как показано на Фиг. 13A, немодифицированное антитело к клаудину 18.2 NBL-014 и Fc-модифицированные антитела NBL-014P, содержащие точечные мутации, введенные для усиления активности АЗКЦ, и NBL-014G, Fc-модифицированный вариант, продуцируемый в клетках HEK в условиях, выбранных для экспрессии антитела, характеризующегося низким содержанием или отсутствием коровой фукозы IgG (например, нефукозилированного или афукозилированного), индуцировали повышенную активность АЗКЦ в клетках CHO-Клаудин 18.2 и клетках PATU8988S.

[0311] В клетках CHO-Клаудин 18.2 с высокой плотностью мишеней NBL-014P и NBL-014G продемонстрировали значения EC50 от 0,06 до 0,02 нМ, что в 10 и 35 раз лучше, чем у немодифицированного исходного антитела NBL-014, которое имеет EC50 для АЗКЦ, равную 0,73 нМ (Фиг. 13A).

[0312] Альтернативный анализ АЗКЦ также использовали для оценки активности АЗКЦ антитела к клаудину 18.2 путем прямого измерения % лизиса клеток-мишеней с использованием линии эффекторных клеток NK92MI-CD16a. Вкратце, клетки-мишени CHO-Клаудин 18.2 окрашивали CFSE в соответствии с инструкциями производителя, затем клетки высевали в 384-луночный планшет с U-образным дном в концентрации 800 тыс./мл в среде RPMI (без антибиотиков). В планшет добавляли серийно разведенные Ат и изотипический контроль. Клетки NK92MI собирали, подсчитывали и разбавляли до указанной концентрации, 320 тыс./мл, затем добавляли 10 мкл/лунка, чтобы получить окончательное соотношение NK92MI к опухолевым клеткам 1:5, инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 4 часов, при 37 °C, 5% CO_2, затем извлекали при комнатной температуре на 10 мин. Добавляли краситель для определения жизнеспоспособности клеток 7-AAD (1:100) и перемешивали в лунке, оставляли на 10 мин, а затем анализировали планшет при помощи FACS для определения способности к гибели/уничтожению клеток (гейт на CFSE-положительные для определения 7-AAD+ мертвых клеток).

[0313] Как показано на Фиг. 13B, Fc-модифицированные антитела NBL-014P и NBL-014G индуцировали умеренно повышенную активность АЗКЦ в этом формате анализа.

Пример 7. Повышенная активность АЗКЦ в опухолевых клетках, эндогенно экспрессирующих клаудин 18,2

[0314] По сравнению с клетками CHO-Клаудин18.2, сверхэкспрессирующими Клаудин18.2, линии опухолевых клеток человека PATU8988S и NUGC-4 эндогенно экспрессируют гораздо меньше клаудина 18.2 (Фиг. 5). Антитела к клаудину 18.2 тестировали на их активность АЗКЦ с использованием линий опухолевых

клеток человека в качестве клеток-мишеней. Активность АЗКЦ антител к клаудину 18.2 измеряли с помощью биолюминесцентного анализа для определения активности антител, которые специфически связываются и активируют человеческий FcγRIIIa. Линии клеток человека, экспрессирующие эндогенный CLDN18.2, высевали в полную среду, содержащую RPMI1640 + 10% FBS, и клетки инкубировали в течение ночи при 37 °C.

[0315] Затем антитела к клаудину 18.2 разводили серийно и добавляли вместе с эффекторными клетками. Жизнеспособность клеток определяли с помощью биолюминесцентного анализа Promega в соответствии с инструкцией производителя (Promega, кат. № 7010). В анализе АЗКЦ линии клеток PATU8988S, NBL-014P и NBL-014G продемонстрировали значения EC50 для АЗКЦ, равную 0,06 нМ и 0,04 нМ, соответственно, которые были увеличены относительно активности АЗКЦ исходного клона NBL-014 (EC50, равную 0,12 нМ, см. Фиг. 13A). Более того, в этой модели клеток поджелудочной железы максимальный эффект АЗКЦ увеличился примерно в 33 раза по сравнению с максимальным ответом АЗКЦ исходного антитела NBL-014 (Фиг. 14B).

[0316] В линии клеток NUGC-4 NBL-014P и NBL-014G показали EC50 для АЗКЦ, равную 0,04 нМ и 0,06 нМ, соответственно, также она была увеличена по сравнению с исходным клоном NBL-014, который имеет EC50 для АЗКЦ, равную 0,40 нМ. Более того, в этом анализе клеток желудка максимальный эффект АЗКЦ увеличился примерно в 3 раза по сравнению с максимальным ответом АЗКЦ исходного антитела NBL-014 (Фиг. 14A).

Пример 8. Комплементзависимая клеточная цитотоксичность (КЗЦ) антител к клаудину 18.2

[0317] Способность антител к клаудину 18.2 индуцировать активность КЗЦ сначала оценивали с использованием линии клеток CHO, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2. Этот анализ КЗЦ на основе проточного цитометра проводили с использованием объединенной сыворотки крови человека от PeproTech (Роки-Хилл, штат Нью-Джерси). Клетки CHO-Клаудин18.2 высевали в 384-луночный планшет по 8000 клеток на лунку. Добавляли 10 мкл выбранных антител при серийном разведении, начиная с концентрации 10 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 15 минут при 37 °C. После инкубации в лунки добавляли 10 мкл человеческой сыворотки с конечным разведением 1/16 на объем. Затем планшет инкубировали в течение 2,5 часов при 37 °C. Краситель для оценки жизнеспособности 7AAD добавляли за 10 минут до сбора данных iQue plus (проточный цитометр).

[0318] В клетках CHO-Клаудин18.2 с высокой плотностью мишеней NBL-014P и NBL-014G демонстрировали сильные значения EC50 от 0,15 до 0,30 нМ, аналогичные его несконструированной форме NBL-014, которая имеет EC50 для КЗЦ 0,22 нМ (Фиг.15). По сравнению с активностью КЗЦ PC1 (полученное самостоятельно iMAb36) (значение EC50 1,76) наблюдаемая активность NBL-014 в виде EC50 улучшена примерно в 10 раз.

[0319] Активность КЗЦ антител к клаудину 18.2 дополнительно оценивали на линиях опухолевых клеток человека PATU8988S, эндогенно экспрессирующих клаудин 18.2. Как показано на Фиг. 16, все из NBL-014, NBL-014P и NBL-014G индуцировали сильную активность КЗЦ в PATU8988S, при этом NBL-014P имел самый высокий % уничтожения путем КЗЦ.

Пример 9. Антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) антител к клаудину 18.2

[0320] Способность антител к клаудину 18.2 индуцировать АЗКФ оценивали с помощью биолюминесцентного анализа Promega. В этом анализе в качестве клеток-мишеней используются клетки CHO, сверхэкспрессирующие клаудин 18.2, или клетки NUGC. Эффекторные клетки культивировали

совместно с клетками-мишенями в присутствии антител к клаудину 18.2. Антитело связывается с мишенью на клетках-мишенях, которые, в свою очередь, активируют FcγRIIa на эффекторных клетках, что приводит к опосредованной NFAT-RE активности люциферазы, которую можно количественно оценить с помощью системы для анализа люциферазы Bio-Glo.

[0321] Вкратце, клетки CHO-Клаудин18.2 или NUGC-4 помещали в буфер для анализа в белые 384-луночные планшеты, 12000/20 мкл/лунка (0,6 М/мл). Эффекторные клетки оттаивали и ресуспендировали до 1 млн/мл и добавляли 10 мкл в аналитический планшет (10000/лунка). Антитела разводили в буфере для анализа и добавляли 10 мкл/лунка поверх клетки-мишени. Планшет с клетками инкубировали в течение ночи. На следующий день непосредственно добавляли 20 мкл субстрата люциферазы в соответствии с инструкциями производителя, планшет центрифугировали и немедленно считывали.

[0322] Активность АЗКФ антител к клаудину 18.2 NBL-014, NBL-014G и NBL-014P показана на Фиг. 17A (клетки CHO-Клаудин 18.2) и Фиг. 17B (клетки NUGC-4). При использовании клетки-мишени с высокой плотностью CLDN18.2 активность Fc-сконструированных антител была аналогична активности их исходных антител, в то время как активность АЗКФ полученного самостоятельно антитела PC1 (iMAb362) характеризовалась высоким ответом, но была менее сильной.

[0323] Использование линии опухолевых клеток человека NUGC-4 (эндогенная экспрессия CLDN18.2) для оценки активности АЗКФ приводит к данным, указывающим на то, что полученное самостоятельно антитело PC1 в 100 раз менее эффективно, но его максимальная активность выше, чем у NBL-014, NBL-014P и NBL-014G.

[0324] На основании этих результатов можно сделать вывод, что активность АЗКФ NBL-014 является сильной независимо от уровня экспрессии клаудина 18.2, и что ни одна из модификаций Fc (белковая инженерия или гликоинженерия) не изменила наблюдаемую активность. Значения EC50 NBL-014G и NBL-014P аналогичны таким значениям у их исходного клона NBL-014. В обеих протестированных линиях клеток CHO-Клаудин 18.2 и NUGC-4, NBL-14, NBL-14G и NBL-14P продемонстрировали лучшую активность АЗКФ с точки зрения значений EC50, чем PC1. Однако эффект АЗКФ при высокой концентрации антител, равной 10 мкг/мл PC1, дает в два раза больший ответ, чем NBL-014.

Пример 10. Противоопухолевая эффективность антител к клаудину 18.2 в модели подкожной опухоли рака поджелудочной железы PATU8988S со сверхэкспрессией клаудина 18.2

[0325] 6-7-недельным самкам голых мышей BALB/c инъецировали 5×10^6 жизнеспособных клеток PATU8988S, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2, в 0,1 мл PBS подкожно в правый бок. Через три дня мышей случайным образом распределяли по группам (N = 10) и начинали лечение путем внутрибрюшинной инъекции (день 0). Группа 1 получала контроль PBS; группа 2 получала 200 мкг антитела изотипического контроля, группа 3 получала 200 мкг NBL-014, а группа 4 получала 200 мкг антитела PC1. Введение осуществляли два раза в неделю в течение 4 недель.

[0326] Массу тела измеряли дважды в неделю. Объемы опухоли определяли в разные моменты времени по формуле V = ½ * L x W x W, , где L – наибольший размер, а W – наименьший размер ксенотрансплантата. Всех мышей с опухолями более 2500 $мм^3$ умерщвляли.

[0327] Как показано на Фиг. 18A, тестируемые антитела NBL-014 и PC1 ингибировали рост опухоли. На 34 день исследования мышей умерщвляли и извлекали опухоли, чтобы измерить их массу. И NBL-014, и полученное самостоятельно антитело PC1 (iMAb362) продемонстрировали сильную противоопухолевую активность при учете массы опухоли в качестве индикатора (Фиг. 18B).

Пример 11. Противоопухолевая эффективность антител к клаудину 18.2 в подкожной модели рака желудка NUGC-4

[0328] 6–7-недельным самкам голых мышей BALB/c инъецировали 5×10^6 жизнеспособных клеток NUGC-4 в 0,1 мл PBS подкожно в правый бок. Через три дня мышей случайным образом распределяли по группам (N = 10) и начинали лечение путем внутрибрюшинной инъекции (день 0). Группа 1 получала контроль PBS; группа 2 получала 200 мкг NBL-014, а группа 3 получала 200 мкг антитела PC1. Введение осуществляли два раза в неделю в течение 5 недель.

[0329] Массу тела измеряли дважды в неделю. Объемы опухоли определяли в разные моменты времени по формуле V = ½ * L x W x W, , где L – наибольший размер, а W – наименьший размер ксенотрансплантата. Всех мышей с опухолями более 2500 $мм^3$ умерщвляли.

[0330] Как показано на Фиг. 19, тестируемое антитело NBL-014 ингибировало рост опухоли. На 35-й день исследования и NBL-014, и PC1 показали значительную противоопухолевую эффективность. NBL-014 проявляло лучшую противоопухолевую активность, чем полученное самостоятельно антитело PC1 (iMAb362).

Пример 12. Противоопухолевая эффективность Fc-сконструированного антитела к клаудину 18.2 в гуманизированной подкожной модели рака желудка в виде гуманизированной NUGC-4 и МКПК

[0331] Для исследования терапевтического потенциала Fc-сконструированного антитела к клаудину 18.2 были выбраны мыши NOG-MHC I/II-2 KO (NOD.Cg-B2m^{em1Tac} Prkdc^{scid} H2-Ab1^{tm1Doi} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac) из лаборатории Джексона из-за пролонгированного терапевтического окна без РТПХ.

[0332] Вкратце, самкам мышей NOG dko в возрасте 6-7 недель прививали 5×10^6 жизнеспособных клеток NUGC-4 в 0,1 мл PBS подкожно в правый бок. Через три дня мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) оттаивали и подсчитывали. 1×10^7 МКПК, разведенных в 300 мкл PBS, прививали каждой мыши через хвостовую вену. Мышей случайным образом распределяли по группам и начинали лечение путем внутрибрюшинной инъекции антител (день 0). Группа 1 получала PBS с МКПК; группа 2 получала 200 мкг NBL-014, который имеет сконструированный человеческий Fc IgG1.

[0333] Введение осуществляли два раза в неделю в течение 5 недель. Приживление МКПК повторяли 4 раза в неделю. Массу тела мышей измеряли дважды в неделю. Объемы опухоли определяли в разные моменты времени по формуле V = ½ * L x W x W, , где L – наибольший размер, а W – наименьший размер ксенотрансплантата. Всех мышей с опухолями более 2500 мм3 умерщвляли.

[0334] Как показано на Фиг. 20A и 20B, группа, получавшая NBL-014, показала значительно уменьшенный объем опухоли (Фиг. 20A) и массу опухоли (Фиг. 20B) по сравнению с контрольной группой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное полностью человеческое антитело к CLDN18.2 человека, причем указанное антитело не связывается с CLDN18.1 человека, и указанное антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 221, CDR2: SEQ ID NO: 222, CDR3: SEQ ID NO: 223, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 224, CDR2: SEQ ID NO: 225, CDR3: SEQ ID NO: 226;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 227, CDR2: SEQ ID NO: 228, CDR3: SEQ ID NO: 229, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 230, CDR2: SEQ ID NO: 231, CDR3: SEQ ID NO: 232;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 233, CDR2: SEQ ID NO: 234, CDR3: SEQ ID NO: 235, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 236, CDR2: SEQ ID NO: 237, CDR3: SEQ ID NO: 238;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 239, CDR2: SEQ ID NO: 240, CDR3: SEQ ID NO: 241, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 242, CDR2: SEQ ID NO: 243, CDR3: SEQ ID NO: 244;

(e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 245, CDR2: SEQ ID NO: 246, CDR3: SEQ ID NO: 247, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 248, CDR2: SEQ ID NO: 249, CDR3: SEQ ID NO: 250;

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 251, CDR2: SEQ ID NO: 252, CDR3: SEQ ID NO: 253, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 254, CDR2: SEQ ID NO: 255, CDR3: SEQ ID NO: 256;

(g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 257, CDR2: SEQ ID NO: 258, CDR3: SEQ ID NO: 259, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 260, CDR2: SEQ ID NO: 261, CDR3: SEQ ID NO: 262;

(h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 263, CDR2: SEQ ID NO: 264, CDR3: SEQ ID NO: 265, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 266, CDR2: SEQ ID NO: 267, CDR3: SEQ ID NO: 268;

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 269, CDR2: SEQ ID NO: 270, CDR3: SEQ ID NO: 271, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 272, CDR2: SEQ ID NO: 273, CDR3: SEQ ID NO: 274;

(j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 275, CDR2: SEQ ID NO: 276, CDR3: SEQ ID NO: 277, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 278, CDR2: SEQ ID NO: 279, CDR3: SEQ ID NO: 280;

(k) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 281, CDR2: SEQ ID NO: 282, CDR3: SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 284, CDR2: SEQ ID NO: 285, CDR3: SEQ ID NO: 286;

(l) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 287, CDR2: SEQ ID NO: 288, CDR3: SEQ ID NO: 289, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 290, CDR2: SEQ ID NO: 291, CDR3: SEQ ID NO: 292;

(m) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 293, CDR2: SEQ ID NO: 294, CDR3: SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 296, CDR2: SEQ ID NO: 297, CDR3: SEQ ID NO: 298;

(n) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 299, CDR2: SEQ ID NO: 300, CDR3: SEQ ID NO: 301, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 302, CDR2: SEQ ID NO: 303, CDR3: SEQ ID NO: 304;

(o) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 311, CDR2: SEQ ID NO: 312, CDR3: SEQ ID NO: 313, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 314, CDR2: SEQ ID NO: 315, CDR3: SEQ ID NO: 316;

(p) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 317, CDR2: SEQ ID NO: 318, CDR3: SEQ ID NO: 319, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 320, CDR2: SEQ ID NO: 321, CDR3: SEQ ID NO: 322; или

(q) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 323, CDR2: SEQ ID NO: 324, CDR3: SEQ ID NO: 325, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 326, CDR2: SEQ ID NO: 327, CDR3: SEQ ID NO: 328.

2. Выделенное антитело к CLDN18.2 человека, причем указанное антитело не связывается с CLDN18.1 человека, и указанное антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 47, CDR2: SEQ ID NO: 48, CDR3: SEQ ID NO: 49, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 50, CDR2: SEQ ID NO: 51, CDR3: SEQ ID NO: 52;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 53, CDR2: SEQ ID NO: 54, CDR3: SEQ ID NO: 55, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 56, CDR2: SEQ ID NO: 57, CDR3: SEQ ID NO: 58;

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 59, CDR2: SEQ ID NO: 60, CDR3: SEQ ID NO: 61, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 62, CDR2: SEQ ID NO: 63, CDR3: SEQ ID NO: 64;

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 65, CDR2: SEQ ID NO: 66, CDR3: SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 68, CDR2: SEQ ID NO: 69, CDR3: SEQ ID NO: 70;

(e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 71, CDR2: SEQ ID NO: 72, CDR3: SEQ ID NO: 73, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 74, CDR2: SEQ ID NO: 75, CDR3: SEQ ID NO: 76;

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 77, CDR2: SEQ ID NO: 78, CDR3: SEQ ID NO: 79, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 80, CDR2: SEQ ID NO: 81, CDR3: SEQ ID NO: 82;

(g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 83, CDR2: SEQ ID NO: 84, CDR3: SEQ ID NO: 85, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 86, CDR2: SEQ ID NO: 87, CDR3: SEQ ID NO: 88;

(h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 89, CDR2: SEQ ID NO: 90, CDR3: SEQ ID NO: 91, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 92, CDR2: SEQ ID NO: 93, CDR3: SEQ ID NO: 94;

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 95, CDR2: SEQ ID NO: 96, CDR3: SEQ ID NO: 97, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 98, CDR2: SEQ ID NO: 99, CDR3: SEQ ID NO: 100;

(j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 101, CDR2: SEQ ID NO: 102, CDR3:

SEQ ID NO: 103, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 104, CDR2: SEQ ID NO: 105, CDR3: SEQ ID NO: 106;

(k) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 107, CDR2: SEQ ID NO: 108, CDR3: SEQ ID NO: 109, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 110, CDR2: SEQ ID NO: 111, CDR3: SEQ ID NO: 112;

(l) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 113, CDR2: SEQ ID NO: 114, CDR3: SEQ ID NO: 115, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 116, CDR2: SEQ ID NO: 117, CDR3: SEQ ID NO: 118;

(m) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 119, CDR2: SEQ ID NO: 120, CDR3: SEQ ID NO: 121, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 122, CDR2: SEQ ID NO: 123, CDR3: SEQ ID NO: 124;

(n) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 125, CDR2: SEQ ID NO: 126, CDR3: SEQ ID NO: 127, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 128, CDR2: SEQ ID NO: 129, CDR3: SEQ ID NO: 130;

(o) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 131, CDR2: SEQ ID NO: 132, CDR3: SEQ ID NO: 133, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 134, CDR2: SEQ ID NO: 135, CDR3: SEQ ID NO: 136;

(p) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 137, CDR2: SEQ ID NO: 138, CDR3: SEQ ID NO: 139, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 140, CDR2: SEQ ID NO: 141, CDR3: SEQ ID NO: 142;

(q) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 143, CDR2: SEQ ID NO: 144, CDR3: SEQ ID NO: 145, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 146, CDR2: SEQ ID NO: 147, CDR3: SEQ ID NO: 148;

(r) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 149, CDR2: SEQ ID NO: 150, CDR3: SEQ ID NO: 151, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 152, CDR2: SEQ ID NO: 153, CDR3: SEQ ID NO: 154;

(s) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 155, CDR2: SEQ ID NO: 156, CDR3: SEQ ID NO: 157, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 158, CDR2: SEQ ID NO: 159, CDR3: SEQ ID NO: 160;

(t) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 161, CDR2: SEQ ID NO: 162, CDR3: SEQ ID NO: 163, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 164, CDR2: SEQ ID NO: 165, CDR3: SEQ ID NO: 166;

(u) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 167, CDR2: SEQ ID NO: 168, CDR3: SEQ ID NO: 169, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 170, CDR2: SEQ ID NO: 171, CDR3: SEQ ID NO: 172;

(v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 173, CDR2: SEQ ID NO: 174, CDR3: SEQ ID NO: 175, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 176, CDR2: SEQ ID NO: 177, CDR3: SEQ ID NO: 178; или

(w) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 179, CDR2: SEQ ID NO: 180, CDR3: SEQ ID NO: 181, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1: SEQ ID NO: 182, CDR2: SEQ ID NO: 183, CDR3: SEQ ID NO: 184.

3. Выделенное антитело к CLDN18.2 человека, причем указанное антитело не связывается с CLDN18.1

человека, и указанное антитело содержит:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 2;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 5 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 6;

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8;

(e) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 10;

(f) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 12;

(g) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 13 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 14;

(h) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 15 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 16;

(i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 18;

(j) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 20;

(k) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 21 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 22;

(l) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 24;

(m) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 25 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 26;

(n) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 27 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 28;

(o) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 29 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 30;

(p) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 31 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 32;

(q) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 33 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 34;

(r) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 35 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 36;

(s) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 37 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 38;

(t) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 39 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 40;

(u) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 41 и последовательность

вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 42;

(v) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 43 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 44; или

(w) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 45 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 46.

4. Антитело к CLDN18.2 по п. 3, причем антитело представляет собой гуманизированное антитело.

5. Антитело к CLDN18.2 по п. 3, причем антитело представляет собой химерное антитело.

6. Выделенное полностью человеческое антитело к CLDN18.2 человека, причем указанное антитело не связывается с CLDN18.1 человека, и указанное антитело содержит:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 185 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 186;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 187 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 188;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 189 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 190;

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 191 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 192;

(e) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 193 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 194;

(f) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 195 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 196;

(g) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 197 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 198;

(h) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 199 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 200;

(i) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 201 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 202;

(j) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 203 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 204;

(k) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 205 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 206;

(l) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 207 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 208;

(m) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 209 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 210;

(n) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 211 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 212;

(o) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 215 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 216;

(p) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 217 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 218; или

(q) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 219 и последовательность

вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 220.

7. Выделенное Fc-модифицированное антитело к CLDN18.2 человека, содержащее последовательности VH и VL, выбранные из следующего:

(a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 2;

(b) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4;

(c) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 201 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 202; и

(d) последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 203 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 204

причем указанное антитело не связывается с CLDN18.1 и при этом дополнительно указанное Fc-модифицированное антитело характеризуется повышенной активностью АЗКЦ по сравнению с активностью АЗКЦ антитела, содержащего те же самые вариабельные области VH и VL в комбинации с доменом Fc человеческого IgG1 дикого типа.

8. Выделенное Fc-модифицированное антитело к CLDN18.2 человека, содержащее рекомбинантную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 336, и легкую цепь, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 337.

9. Выделенное Fc-модифицированное антитело к CLDN18.2 человека, содержащее рекомбинантную тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 338, и легкую цепь, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 337.

10. Выделенное антитело к CLDN18.2 человека по п. 6, в котором

Fc-модифицированное антитело характеризуется повышенной активностью АЗКЦ по сравнению с активностью АЗКЦ антитела, содержащего те же самые вариабельные области VH и VL в комбинации с доменом Fc человеческого IgG1 дикого типа.

Ms1_VH SEQ ID NO: 1
EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAYTRYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTNYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGGYYGNAMDYWGQGTSVTVSS

GYAYTRYN	IDPYNGGT	ARGGYYGNAMDY
SEQ:47	SEQ:48	SEQ:49

Ms1_VL SEQ ID NO: 2
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSIYYCQSNYIYPFTFGAGTTLELQ

QSLLNSGNQKNY	WAS	QSNYIYPFT
SEQ:50	SEQ:51	SEQ:52

Ms2_VH SEQ ID NO: 3
QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSA
LMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARDFTTATGFDYWGQGTTLTVSS

GFSLTSYG	IWAGGST	ARDFTTATGFDY
SEQ:53	SEQ:54	SEQ:55

Ms2_VL SEQ ID NO: 4
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGSGTKLEIK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHSYPFT
SEQ ID:56	SEQ ID:57	SEQ ID:58

Ms3-VH1 SEQ ID NO: 5
EVMLVESGGGIVKPGGSLKLSCAASGFTLSSYTMSWVRQTPERRLEWVATIIIGGSYTYYPDS
VKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQGYGNSFPYWGQGTLVTVSA

GFTLSSYT	IIIGGSYT	ARQGYGNSFPY
SEQ ID:59	SEQ ID:60	SEQ ID:61

Ms3 _VL SEQ ID NO: 6
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

QSLLNSGNQKNY	WAS	QNDYSYPFT
SEQ ID:62	SEQ ID:63	SEQ ID:64

ФИГ. 1

Ms4_VH SEQ ID NO: 7
EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWIGNIDPYYGGTRYN
QKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARLGLGNAMDYWGQGTSVTVSS

GYSFTGYN	IDPYYGGT	ARLGLGNAMDY
SEQ ID:65	SEQ ID:66	SEQ ID:67

Ms4_VL SEQ ID NO: 8
DIVMTQSPSFLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKSYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYYYPFTFGSGTELEIK

QSLLNSGNQKSY	WAS	QNDYYYPFT
SEQ ID:68	SEQ ID:69	SEQ ID:70

Ms5_VH SEQ ID NO: 9
QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYLMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSNGRTNYN
EKFKSKAALTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLAYGYGNAVDYWGQGTSVTVSS

GYTFTRYL	INPSNGRT	ARLAYGYGNAVDY
SEQ ID:71	SEQ ID:72	SEQ ID:73

Ms5_VL SEQ ID NO: 10
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHSYPLT
SEQ ID:74	SEQ ID:75	SEQ ID:76

Ms6_VH SEQ ID NO: 11
QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCRASGYTFTSYLMHWIKQRPGQALEWIGYINPTTDYTEYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCGRLGYYKRNAMDHWGQGTSVTVSS

GYTFTSYL	INPTTDYT	GRLGYYKRNAMDH
SEQ ID:77	SEQ ID:78	SEQ ID:79

Ms6_VL SEQ ID NO: 12
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHFYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHFYPLT
SEQ ID:80	SEQ ID:81	SEQ ID:82

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms7.2_VH1 SEQ ID NO: 13
EVKLVESGGDLVQPGGSLRLSCTTPGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAASRNKANDYTTE
NSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARDACPWDWFAYWGQGTLVTVSA

GFTFSDFY	SRNKANDYTT	ARDACPWDWFAY
SEQ ID:83	SEQ ID:84	SEQ ID:85

Ms7.2_VL SEQ ID NO: 14
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK

QSLLNSGNQKNY	WAS	QNDYSYPFT
SEQ ID:86	SEQ ID:87	SEQ ID:88

Ms8_VH SEQ ID NO: 15
EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASDYAFTRYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTNYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGGYYGNAMDYWGQGTSVTVSS

DYAFTRYN	IDPYNGGT	ARGGYYGNAMDY
SEQ ID:89	SEQ ID:90	SEQ ID:91

Ms8_VL SEQ ID NO: 16
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPQLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSIYYCQSNYIYPFTFGAGTTLELQ

QSLLNSGNQKNY	WAS	QSNYIYPFT
SEQ ID:92	SEQ ID:93	SEQ ID:94

Ms9_VH SEQ ID NO: 17
QVQLQQPGAEPVKPGASVKLSCKASGYTFTSYLIHWVKXRPGQGLEWIGEIIPSNGRTTYNE
KFKTKASLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLAYGYGNAVDYWGQGTSVTVSS

GYTFTSYL	IIPSNGRT	ARLAYGYGNAVDY
SEQ ID:95	SEQ ID:96	SEQ ID:97

Ms9_VL SEQ ID NO: 18
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHTYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHTYPLT
SEQ ID:98	SEQ ID:99	SEQ ID:100

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms10_VH SEQ ID NO: 19
EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYKMNWVKQSNGKSLEWIGHIDPYYGGPRYN
KKFMGKATLTVDRSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARLDYGNSFAYWGQGTLVTVSA

GYSFTGYK	IDPYYGGP	ARLDYGNSFAY
SEQ ID:101	SEQ ID:102	SEQ ID:103

Ms10_VL SEQ ID NO: 20
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGGGTKLEIK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHSYPFT
SEQ ID:104	SEQ ID:105	SEQ ID:106

Ms11_VH SEQ ID NO:21
QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKAFGYTFTTYSIEWMKQNHGKSLEWIGNFRPYNDDTKC
NEKFKGKAKLTVEKSSSTVYLELSRLTSDDSAVYYCARGSYGNSFAYWGQGTLVTVSA

GYTFTTYS	FRPYNDDT	ARGSYGNSFAY
SEQ ID:107	SEQ ID:108	SEQ ID:109

Ms11_VL SEQ ID NO:22
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPFTFGSGTKLEIK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHSYPFT
SEQ ID:110	SEQ ID:111	SEQ ID:112

Ms12_VH SEQ ID NO: 23
EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFASYKMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGVTSYN
QKFRGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGAYYGNSFDYWGQGTTLTVSS

GYAFASYK	IDPYNGVT	ARGAYYGNSFDY
SEQ ID:113	SEQ ID:114	SEQ ID:115

Ms12_VL SEQ ID NO: 24
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQQPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAVDLAVYYCQSAYSFPYTFGGGTKLEVK

QSLLNSGNQKNY	WAS	QSAYSFPYT
SEQ ID:116	SEQ ID:117	SEQ ID:118

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms13_VH SEQ ID NO: 25
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYIMHWVKQKPGQGLEWIGYFNPYNDDSKTS
EKFKGKATLTSDKSSSTAYMEINSLTSEDSAVYYCAKLRQERIAYWGQGTLVTVSA

GYTFTRYI	FNPYNDDS	AKLRQERIAY
SEQ ID:119	SEQ ID:120	SEQ ID:121

Ms13_VL SEQ ID NO: 26
DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNIDVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG
FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK

QNIDVW	KAS	QQGQSYPLT
SEQ ID:122	SEQ ID:123	SEQ ID:124

Ms14 _VH SEQ ID NO: 27
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTRYIIHWVKQKPGQGLEWIGYFNPYNDDSKNN
EKFKGKATLTSDKSSSTAYMEISSLTSEDSAVYYCAKLRQERIAYWGQGTLVTVSA

GYTFTRYI	FNPYNDDS	AKLRQERIAY
SEQ ID:125	SEQ ID:126	SEQ ID:127

Ms14_VL SEQ ID NO: 28

DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHVSQNIDVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG
FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK

QNIDVW	KAS	QQGQSYPLT
SEQ ID:128	SEQ ID:129	SEQ ID:130

Ms15_VH SEQ ID NO: 29
EVQLQQSGPELVRPGASVKMSCRASGYTFTNYIIHWVKQKPGQGLEWIGYFNPYNDGTKYN
EIFKDKATLTSDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAKLRQERIAYWGQGTLVTVSA

GYTFTNYI	FNPYNDGT	AKLRQERIAY
SEQ ID:131	SEQ ID:132	SEQ ID:133

Ms15_VL SEQ ID NO: 30
DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHVSQNIDVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG
FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK

QNIDVW	KAS	QQGQSYPLT
SEQ ID:134	SEQ ID:135	SEQ ID:136

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms16_VH SEQ ID NO: 31
QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNE
KLKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSGDSAVYFCARYVKGNALDYWGQGTSVTVSS

GYAFTNYL	INPGSGGT	ARYVKGNALDY
SEQ ID:137	SEQ ID:138	SEQ ID:139

Ms16_VL SEQ ID NO: 32
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLSCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFT
GSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNSYSFPLTFGAGTKLELT

QSLFNSGNQKNY	WAS	QNSYSFPLT
SEQ ID:140	SEQ ID:141	SEQ ID:142

Ms17_VH SEQ ID NO: 33
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQKPGQGLEWIGYFNPYNDGIEYSE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCSKLRQERFAYWGQGTLVTVSA

GYTFTNYI	FNPYNDGI	SKLRQERFAY
SEQ ID:143	SEQ ID:144	SEQ ID:145

Ms17_VL SEQ ID NO: 34
DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTG
FTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGAGTKLELK

QNINVW	KAS	QQGQSYPLT
SEQ ID:146	SEQ ID:147	SEQ ID:148

Ms18_VH SEQ ID NO: 35
QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLISYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGNTNYNSA
LMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARVYYGNSFDYWGQGTTLTVSS

GFSLISYG	IWAGGNT	ARVYYGNSFDY
SEQ ID:149	SEQ ID:150	SEQ ID:151

Ms18_VL SEQ ID NO: 36
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRF
TGSGSGTDFSLTISSVQAEDLAVYYCHNDYTYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	WAS	HNDYTYPLT
SEQ ID:152	SEQ ID:153	SEQ ID:154

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms19_VH SEQ ID NO: 37
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGSKYN
EKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREGYGKRNALDYWGQGTSVTVSS

GYTFTSYV	INPYNDGS	AREGYGKRNALDY
SEQ ID:155	SEQ ID:156	SEQ ID:157

Ms19_VL SEQ ID NO: 38
DIVMTQSPSSLSVSAGERVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFT
GSGSGTDFTLTISSVQVEDLAVYYCQNDHFYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	GAS	QNDHFYPLT
SEQ ID:158	SEQ ID:159	SEQ ID:160

Ms20_VH SEQ ID NO: 39
EIQLQQSGPELMKPGASVKISCKASGYSFTSYYMHWVKQSHGKSLEWIGYFDPYNGGTNYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCACYRFFAVWGAGTTVTVSS

GYSFTSYY	FDPYNGGT	ACYRFFAV
SEQ ID:161	SEQ ID:162	SEQ ID:163

Ms20_VL SEQ ID NO: 40
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK

QSLLNSGNQKNY	WAS	QNDYSYPLT
SEQ ID:164	SEQ ID:165	SEQ ID:166

Ms21_VH SEQ ID NO: 41
DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPEKGLEWVAFINGDSSSIYYA
DTVKGRFTISRDNPKNILFLQMTSLRSEDTAMYYCARFARGNSFDYWGQGTTLTVSS

GFTFSTFG	INGDSSSI	ARFARGNSFDY
SEQ ID:167	SEQ ID:168	SEQ ID:169

Ms21_VL SEQ ID NO: 42
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFNSGNQKNYLTWYQQKPWQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTITSVQTEDLAVYYCQIGYTYPLTFGAGTKLELK

QSLFNSGNQKNY	WAS	QIGYTYPLT
SEQ ID:170	SEQ ID:171	SEQ ID:172

ФИГ. 1 (продолж.)

Ms22_VH SEQ ID NO: 43
QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSNGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSALMSRLSI
SKDNSKSQVFLKMNSLQTHDTAMYYCARDKYDGTGFDYWGQGTTLTVSS

GFSLTSNG	IWAGGST	ARDKYDGTGFDY
SEQ ID:173	SEQ ID:174	SEQ ID:175

Ms22_VL SEQ ID NO: 44
QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSNMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTS
YSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPYTFGGGTKLEIK

SSVSN	DTS	QQWSSYPYT
SEQ ID:176	SEQ ID:177	SEQ ID:178

Ms23_VH SEQ ID NO: 45
EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTRYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTNYN
QKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGGYYGNAMDYWGQGTSVTVSS

GYAFTRYN	IDPYNGGT	ARGGYYGNAMDY
SEQ ID:179	SEQ ID:180	SEQ ID:181

Ms23_VL SEQ ID NO: 46
DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLSIYYCQSNYIYPFTFGAGTTLELQ

QSLLNSGNQKNY	WAS	QSNYIYPFT
SEQ ID:182	SEQ ID:183	SEQ ID:184

ФИГ. 1 (продолж.)

Hu-1_VH SEQ ID NO: 185
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMYWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKNYADSVK
GRFTISRDNSKNTLNLQMNSLRAEDTAVYYCARRGYDILTGYDYYGMDVWGQGTTVTVSA

GFTFSNYG	IWYDGSNK	ARRGYDILTGYDYYGMDV
SEQ ID:221	SEQ ID:222	SEQ ID:223

Hu-1_VL SEQ ID NO: 186
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPSWYQQTPGQAPRTLIYRTNTRSSGVPDRFSGSILG
NKAALTISGAQADDESNYYCVLYMGSGIWVFGGGTKLTVL

SGSVSTSYY	RTN	VLYMGSGIWV
SEQ ID:224	SEQ ID:225	SEQ ID:226

Hu-2_VH SEQ ID NO: 187
QLRLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISSSRSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTI
SVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARQTLRYFDWLSPFDYWGQGTLVTVSS

GGSISSSRSY	IYYSGST	ARQTLRYFDWLSPFDY
SEQ ID:227	SEQ ID:228	SEQ ID:229

Hu-2_VL SEQ ID NO: 188
EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNYLSWYQQKPGQAPRLLIYGTSTRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFAVYFCQQDYNLPITFGQGTRLEIK

QSVRSNY	GTS	QQDYNLPIT
SEQ ID:230	SEQ ID:231	SEQ ID:232

Hu-3_VH SEQ ID NO: 189
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDGPISSSRYYWGWIRQPPGKGLEWIGSFHYSGSTYYNPSLKSRVT
ISADTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLVLRYFDWLGFFDLWGRGTLVTVSS

DGPISSSRYY	FHYSGST	ARLVLRYFDWLGFFDL
SEQ ID:233	SEQ ID:234	SEQ ID:235

Hu-3_VL SEQ ID NO: 190
EIVMTQSPAILSLSPGERAALSCRASQSVRSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGTSTRATGIPARFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPITFGQGTRLEFK

QSVRSSY	GTS	QQDYNLPIT
SEQ ID:236	SEQ ID:237	SEQ ID:238

ФИГ. 2

Hu-4_VH SEQ ID NO: 191
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSFYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKNYVDSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRNYDILTGRDYYGMDVWGQGTTVTVSS

GFTFSFYG	IWYDGSNK	ARRNYDILTGRDYYGMDV
SEQ ID:239	SEQ ID:240	SEQ ID:241

Hu-4_VL SEQ ID NO: 192
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLNSGSVSTSYYPSWYQQTPGQAPRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILG
NKAALTITGAQADDDSDYYCVLYMGSGIWVFGGGTKLTVL

SGSVSTSYY	STN	VLYMGSGIWV
SEQ ID:242	SEQ ID:243	SEQ ID:244

Hu-5_VH SEQ ID NO: 193
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFTSSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGRTNYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDHYDIFTTYYPRGMDVWGQGTTVTVSS

GYTFTSSY	INPSGGRT	ARDHYDIFTTYYPRGMDV
SEQ ID:245	SEQ ID:246	SEQ ID:247

Hu-5_VL SEQ ID NO: 194
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTE
FTLTISSLQPEDFTTYYCLQHNSFPFTFGQGTELEIR

QGIRND	AAS	LQHNSFPFT
SEQ ID:248	SEQ ID:249	SEQ ID:250

Hu-6_VH SEQ ID NO: 195
QMQLRESGPGLVKPSETLSLTCTVSNGPISSSRYYWGWIRQPPGKGLEWIGSFHYSGSTYYKPSLKSRV
TISADTSKNQLSLELSSVTAADTAVYYCARLVLRYFDWLGYFDLWGRGTLVTVSS

NGPISSSRYY	FHYSGST	ARLVLRYFDWLGYFDL
SEQ ID:251	SEQ ID:252	SEQ ID:253

Hu-6_VL SEQ ID NO: 196
EFVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIRSNYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATAIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPITFGQGTRLEIK

QSIRSNY	GAS	QQDYNLPIT
SEQ ID:254	SEQ ID:255	SEQ ID:256

ФИГ. 2 (продолж.)

Hu-7_VH1 SEQ ID NO: 197
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGSTYYADSVKDRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGKPLLGGTGLWDYWGQGTLVTVSS

GFTFSSYV	ISGSGGST	GKPLLGGTGLWDY
SEQ ID:257	SEQ ID:258	SEQ ID:259

Hu-7_VL SEQ ID NO: 198
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDSSNRATGVPARFSGSGSGTD
FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

QSVSSY	DSS	QQRSNWPLT
SEQ ID:260	SEQ ID:261	SEQ ID:262

Hu-8_VH SEQ ID NO: 199
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKKYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRYDVLTAYPYYFYYNMDVWGPGTTVTVSS

GFTFSSYG	IWYDGSNK	ARRYDVLTAYPYYFYYNMDV
SEQ ID:263	SEQ ID:264	SEQ ID:265

Hu-8_VL SEQ ID NO: 200
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLNSGSVSTSYYPSWYQQTPGQAPRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILG
NKAALTITGAQADDESDYYCVLYMGSGIWVFGGGTKLTVL

SGSVSTSYY	STN	VLYMGSGIWV
SEQ ID:266	SEQ ID:267	SEQ ID:268

Hu-9_VH SEQ ID NO: 201
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRSTYYA
ASMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKSLSYYHYYFDYWGQGTLVTVTS

GFTFSSFA	LSGSGRST	AKSLSYYHYYFDY
SEQ ID:269	SEQ ID:270	SEQ ID:271

Hu-9_VL SEQ ID NO: 202
DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRASQGISNFLAWYQQKPGKAPELLIHSASTLQSGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISNLQPQDFATYYCQQVNSYPLTFGGGTKVEIK

QGISNF	SAS	QQVNSYPLT
SEQ ID:272	SEQ ID:273	SEQ ID:274

ФИГ. 2 (продолж.)

Hu-10_VH SEQ ID NO: 203
EVQLSESGGALVQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSSLSGSGRSTYYA
ASIKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAIYYCAKSLSYYHYYFDYWGQGTLVTVSS

GFTFSSYA	LSGSGRST	AKSLSYYHYYFDY
SEQ ID:275	SEQ ID:276	SEQ ID:277

Hu-10_VL SEQ ID NO: 204
DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLQSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISSLQPEDFASYHCQQVKTYPLTFGGGTKVEIK

QDISNY	SAS	QQVKTYPLT
SEQ ID:278	SEQ ID:279	SEQ ID:280

Hu-11_VH SEQ ID NO: 205
QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGNTIYA
QKFQGRVTMTRDTSTTTVYVELSSLRSEDTAVYYCARDHYDILTGYYPLYYGMDVWGQGT
TVTVSS

GYTFTSYY	INPSGGNT	ARDHYDILTGYYPLYYGMDV
SEQ ID:281	SEQ ID:282	SEQ ID:283

Hu-11_VL SEQ ID NO: 206
SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSG
SKSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSSTAVFGGGTQLTAL

NIGSKN	RDS	QVWDSSTAV
SEQ ID:284	SEQ ID:285	SEQ ID:286

Hu-12_VH SEQ ID NO: 207
EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCIASGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQISSLRAEDTAVYYCTKAPTLWWFFDLWGRGTLVTVSS

GFTFSSYV	ISGSGGST	TKAPTLWWFFDL
SEQ ID:287	SEQ ID:288	SEQ ID:289

Hu-12_VL SEQ ID NO: 208
DIQVTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGIRSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISSLLPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK

QGIRSY	AAS	QQLNSYPLT
SEQ ID:290	SEQ ID:291	SEQ ID:292

ФИГ. 2 (продолж.)

Hu-13_VH SEQ ID NO: 209
EVQLLESGGGLVQPGGSLRVACAASGFPLRSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTSGSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGYDILTGYYDYFYGMDVWGQ
GTTVTVSS

GFPLRSYA	TSGSGGST	AKDRGYDILTGYYDYFYGMDV
SEQ ID:293	SEQ ID:294	SEQ ID:295

Hu-13_VL SEQ ID NO: 210
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPYTFGQGTKLEIK

QGIRND	AAS	LQHNSYPYT
SEQ ID:296	SEQ ID:297	SEQ ID:298

Hu-14_VH SEQ ID NO: 211
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSSYAMSWVRQVPGKGLEWVSVISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGYDILTTYYDYFYGMDVWGQPEF
QHTGG

GITFSSYA	ISGSGGST	AKDRGYDILTTYYDYFYGMDV
SEQ ID:299	SEQ ID:300	SEQ ID:301

Hu-14_VL SEQ ID NO: 212
DIQMTQSPSSLSASVGDRVIITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISSLQPEDLASYYCLQHNSYPYTFGQGTKLEIK

QGIRND	AAS	LQHNSYPYT
SEQ ID:302	SEQ ID:303	SEQ ID:304

Hu-16_VH SEQ ID NO: 215
EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGLIFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVIGGSGSNTFYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGYDILTGYYNYYYGMDVWGQGI
TVTVSS

GLIFSSYA	IGGSGSNT	AKDRGYDILTGYYNYYYGMDV
SEQ ID:311	SEQ ID:312	SEQ ID:313

Hu-16_VL SEQ ID NO: 216
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPYTFGQGTKLEIK

QGIRND	AAS	LQHNSYPYT
SEQ ID:314	SEQ ID:315	SEQ ID:316

ФИГ. 2 (продолж.)

HU-17_VH SEQ ID NO: 217

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCRVSGYTLTALSMYWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGETIY
AQKFQGRVTMTEDTSTGTAYMELSSLKSEDTAVYYCATRLRYFDWNYWGQGTPVTVSS

GYTLTALS	FDPEDGET	ATRLRYFDWNY
SEQ ID:317	SEQ ID:318	SEQ ID:319

Hu-17_VL SEQ ID NO: 218
DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKVSKRFSGVPDRFSGS
GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQGTQFPRTFGQGTKVEIK

QSLVHSDGNTY	KVS	TQGTQFPRT
SEQ ID:320	SEQ ID:321	SEQ ID:322

Hu-18 17001.C8.2F9.1E1_VH SEQ ID NO: 219

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRVSGYTLSALSMYWVRQAPGKGLEWMGGFDPEDGKTIY
AQKFQGRVTMTEDTSTGTAYMELSSLRSEDTAIYYCATTLRYFDWNYWGQGTPVTVSS

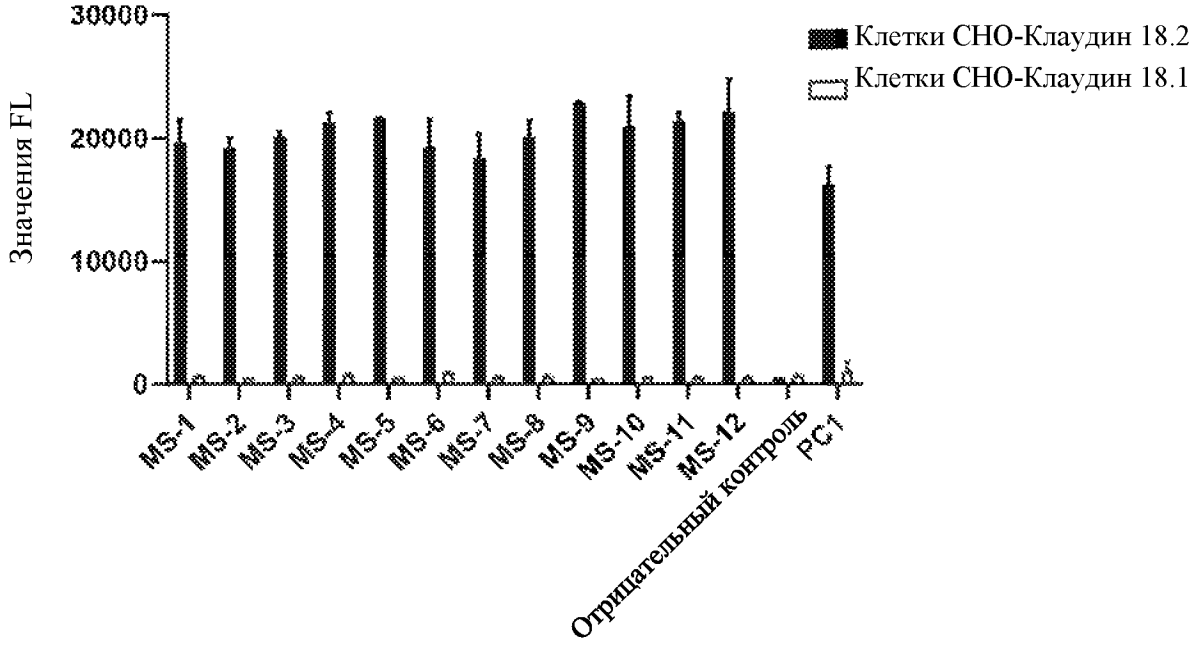
GYTLSALS	FDPEDGKT	ATTLRYFDWNY
SEQ ID:323	SEQ ID:324	SEQ ID:325

Hu-18_VL SEQ ID NO: 220
DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKVSKRFSGVPDRFSGS
GAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQGTQFPRTFGQGTKVEIK

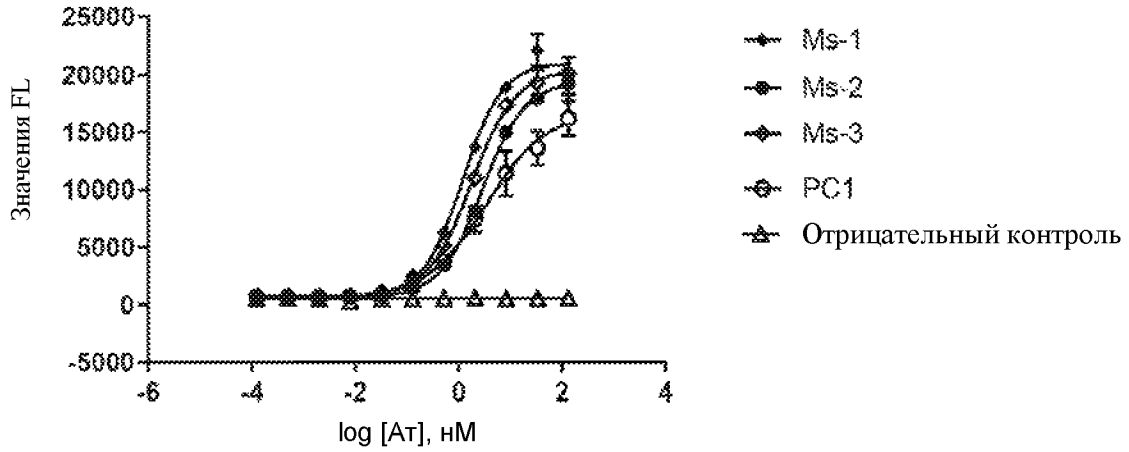
QSLVHSDGNTY	KVS	TQGTQFPRT
SEQ ID:326	SEQ ID:327	SEQ ID:328

ФИГ. 2 (продолж.)

Связывание мышиных антител

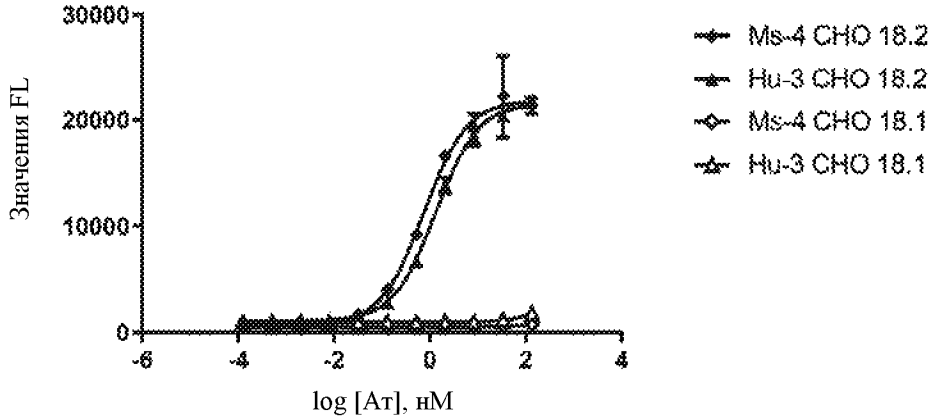


ФИГ. 3А



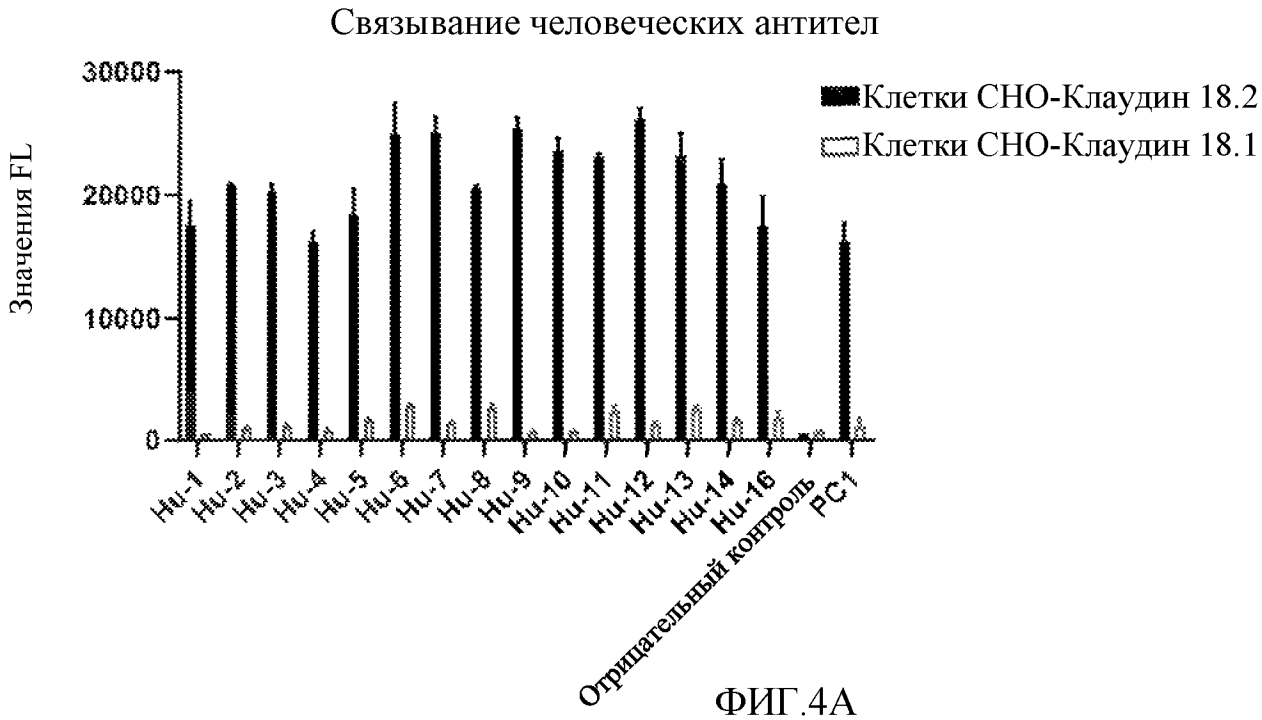
	Ms-1	Ms-2	Ms-3	PC1	Отрица-тельный контроль
EC50, нМ	1.2	2.8	1.8	3.2	Неактивный

ФИГ. 3В

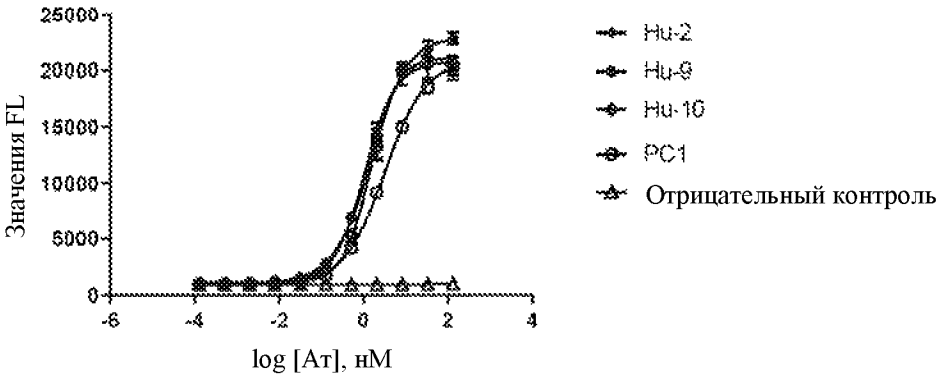


	Ms-4 CHO CLDN18.2	Hu-3 CHO CLDN18.2	Ms-4 CHO CLDN18.1	Hu-3 CHO CLDN18.1
EC50, нМ	0.75	1.34	Неактивный	Неактивный

ФИГ. 3С

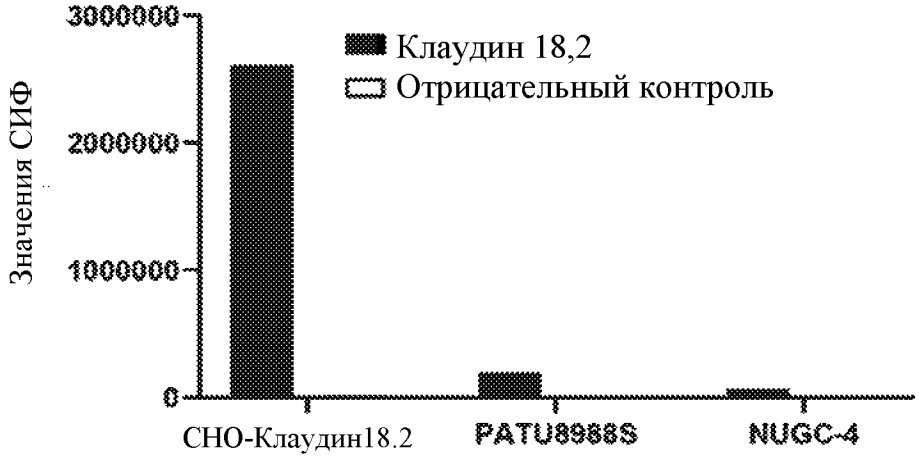


ФИГ.4А



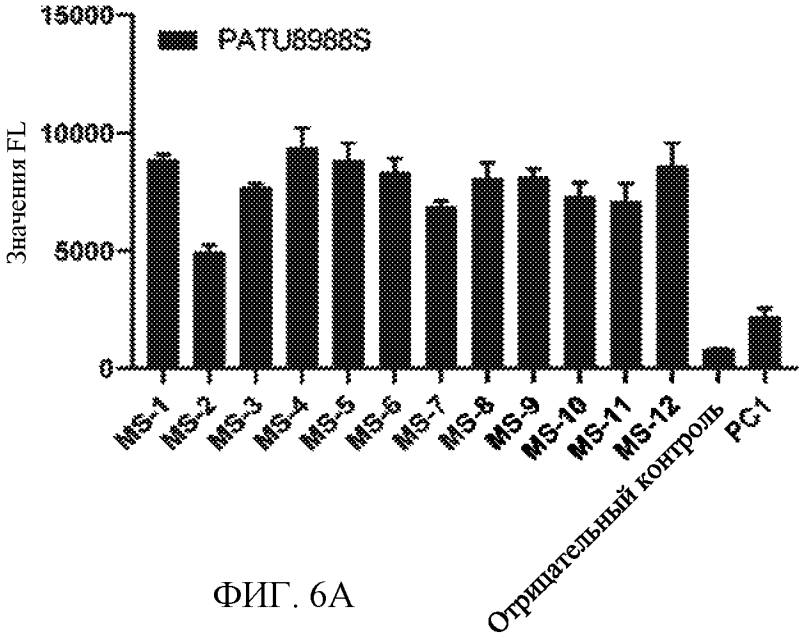
	Hu-2	Hu-9	Hu-10	PC1	Отрицательный контроль
EC50, нМ	1.5	1.1	1.5	3.2	Неактивный

ФИГ. 4В


3000000
2000000
1000000
0
Значения СИФ
Клаудин 18,2
Отрицательный контроль
CHO-Клаудин18.2
PATU8988S
NUGC-4

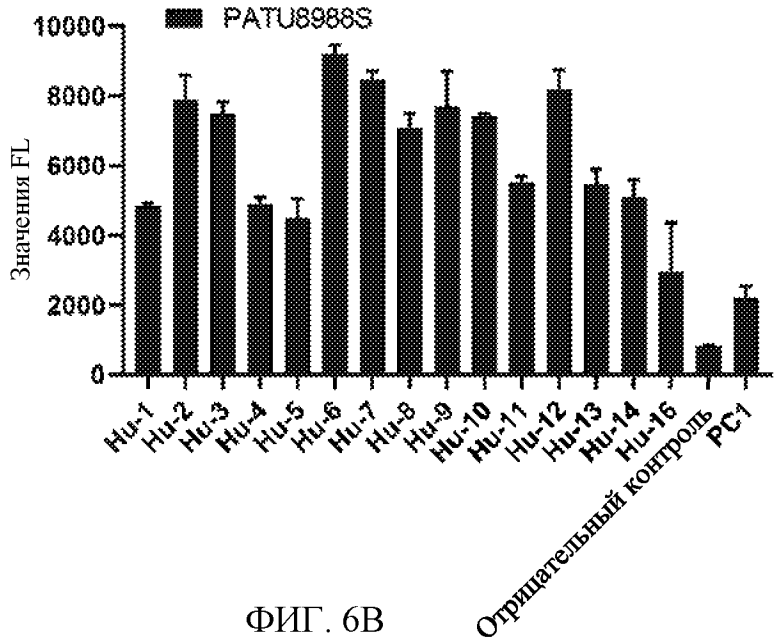
ФИГ. 5

Связывание мышиных антител

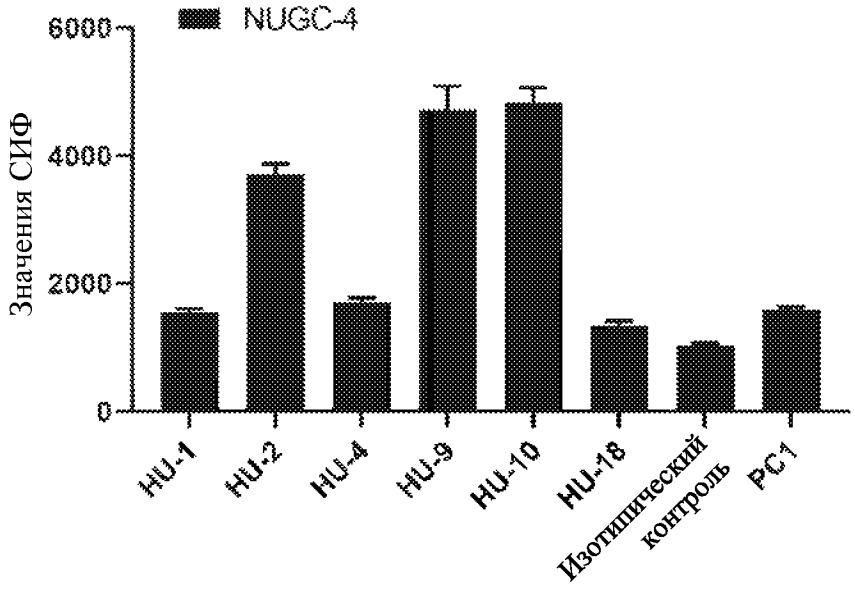


ФИГ. 6А

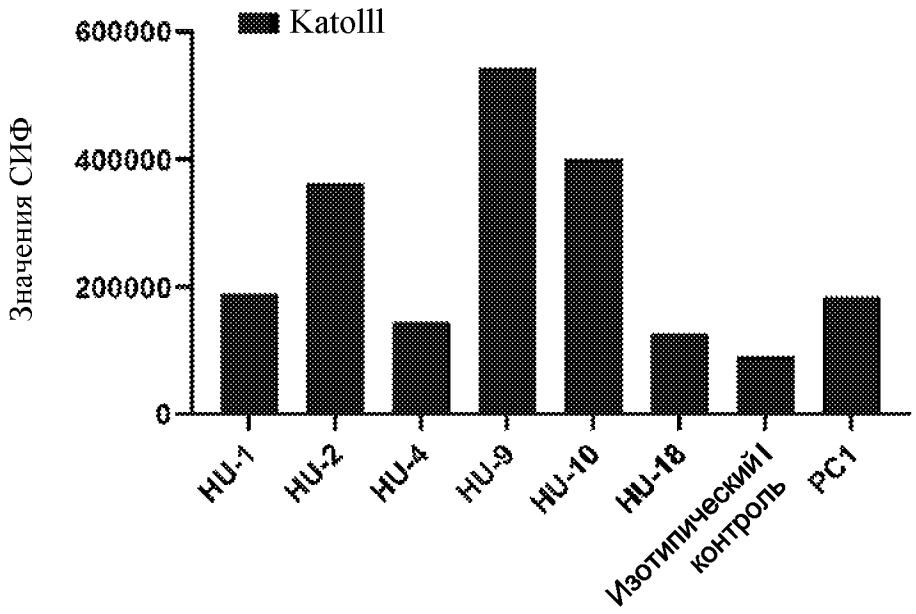
Связывание человеческих антител



ФИГ. 6В

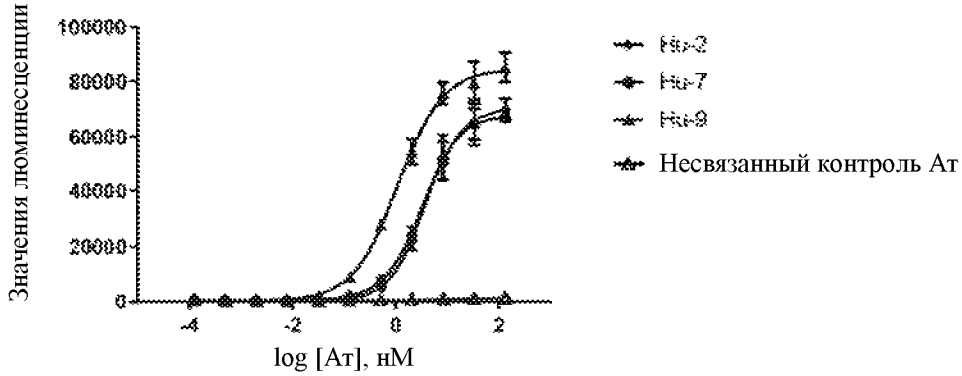

NUGC-4
Значения СИФ
6000
4000
2000
0
HU-1
HU-2
HU-4
HU-9
HU-10
HU-18
Изотипический контроль
PC1

ФИГ. 7


Katolll
600000
400000
200000
0
Значения СИФ
HU-1
HU-2
HU-4
HU-9
HU-10
HU-18
Изотипический контроль
PC1

ФИГ. 8

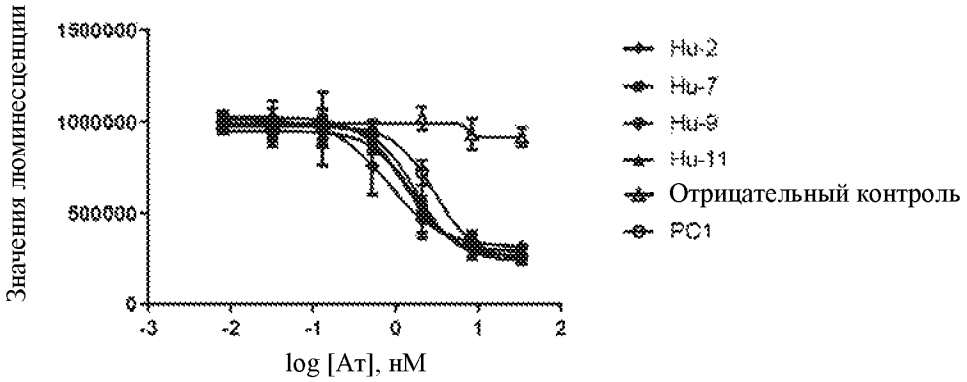
Активность АЗКЦ антител к клаудину 18.2



	Hu-2	Hu-7	Hu-9	Несвязанный контроль Ат
EC50, нМ	3,51	3,52	1,10	Неактивный

ФИГ. 9

Эндоцитоз антитела к клаудину-18.2



	Hu-2	Hu-7	Hu-9	Hu-11	Несвязанный контроль Ат	PC1
EC50, нМ	1.428	1.718	0.791	1.478	>133.4	2.927

ФИГ. 10

Идентификатор последовательности	ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ IgG1 ЧЕЛОВЕКА
SEQ ID NO: 331	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 332	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 333	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 334	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

ФИГ. 11А

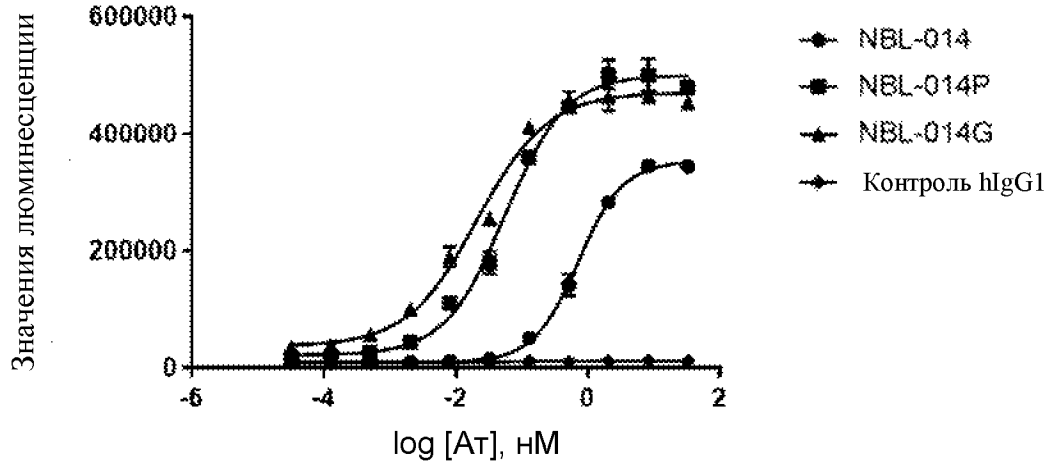
Идентификатор последовательности	ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ IgG1 ЧЕЛОВЕКА
SEQ ID NO: 335	KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

ФИГ. 11B

Идентификатор последовательности	ТЯЖЕЛЫЕ ЦЕПИ И ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ NBL-014
SEQ ID NO: 336	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRQAPGKGLEW VSSLSGSGRSTYYAASMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYY CAKSLSYYHYYFDYWGQGTLVTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPPEEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 338	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFAMTWVRQAPGKGLEW VSSLSGSGRSTYYAASMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYY CAKSLSYYHYYFDYWGQGTLVTVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVG GPSVFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPPEEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 337	DIQLTQSPSFLSASVGDRVPITCRASQGISNFLAWYQQKPGKAPELLIHS ASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPQDFATYYCQQVNSYPLTFG GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФИГ. 12

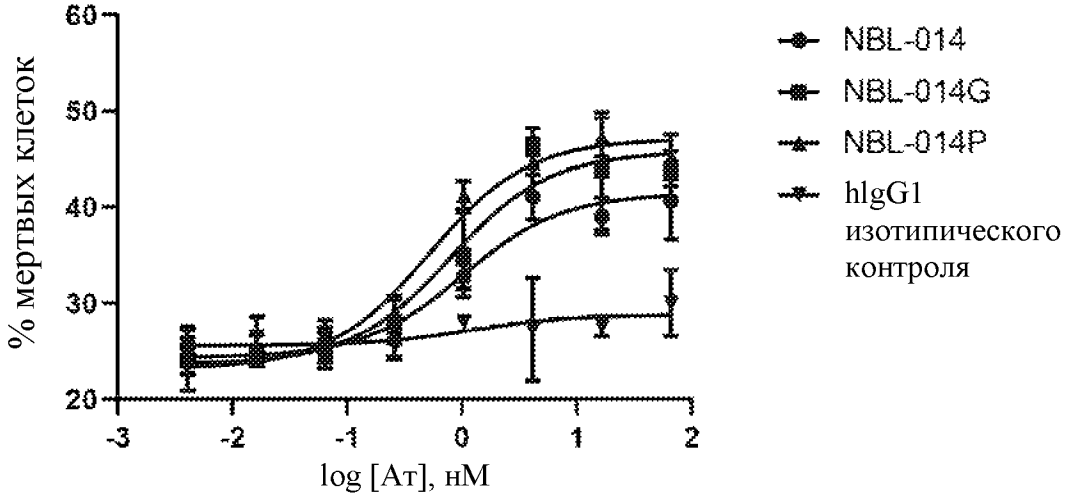
АЗКЦ клеток CHO-Клаудин 18.2



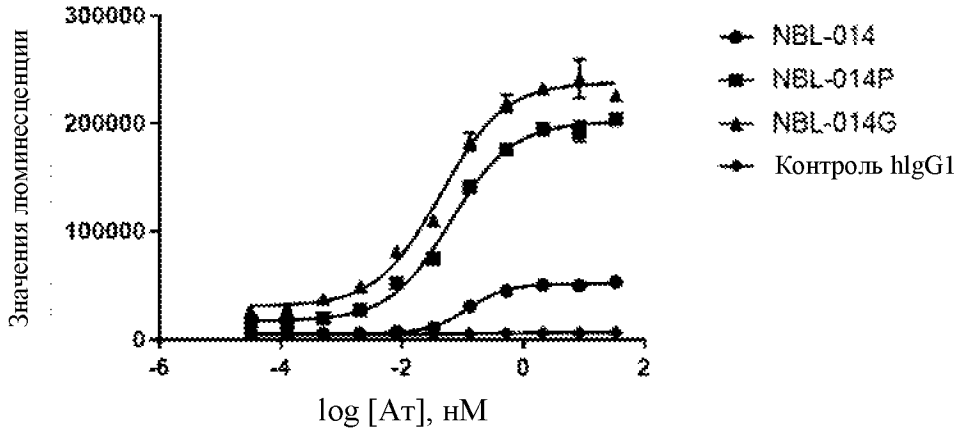
	NBL-014	NBL-014P	NBL-014G	Контроль hIgG1
EC50, нМ	0.73	0.06	0.02	Неактивный

ФИГ. 13A

АЗКЦ на CHO-Клаудин 18.2



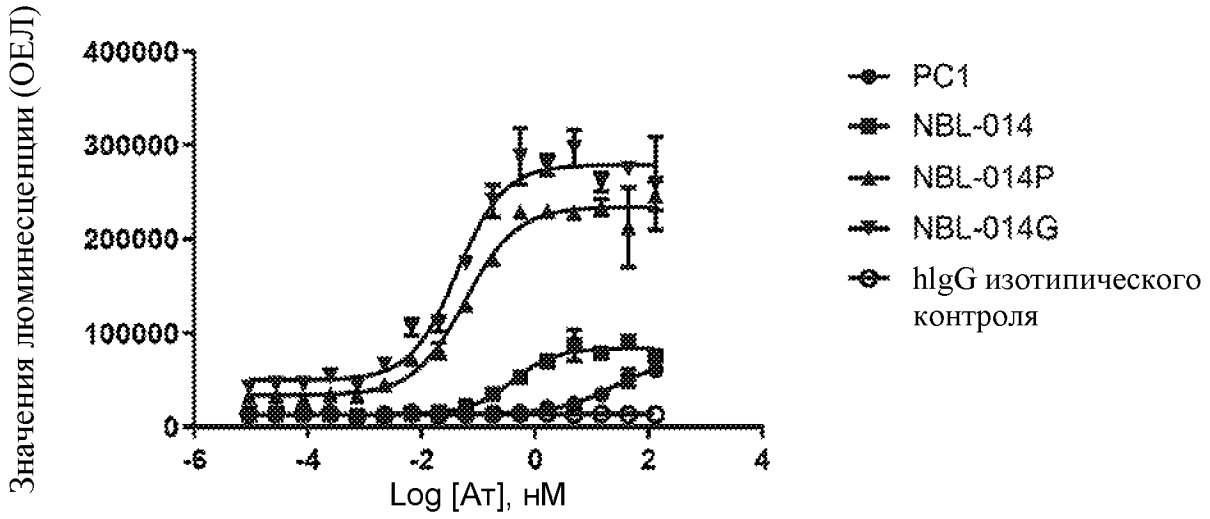
ФИГ. 13B



	NBL-014	NBL-014P	NBL-014G	Контроль hlgG1
EC50, нМ	0.12	0.06	0.04	Неактивный

АЗКЦ клеток NUGC-4

ФИГ. 14A

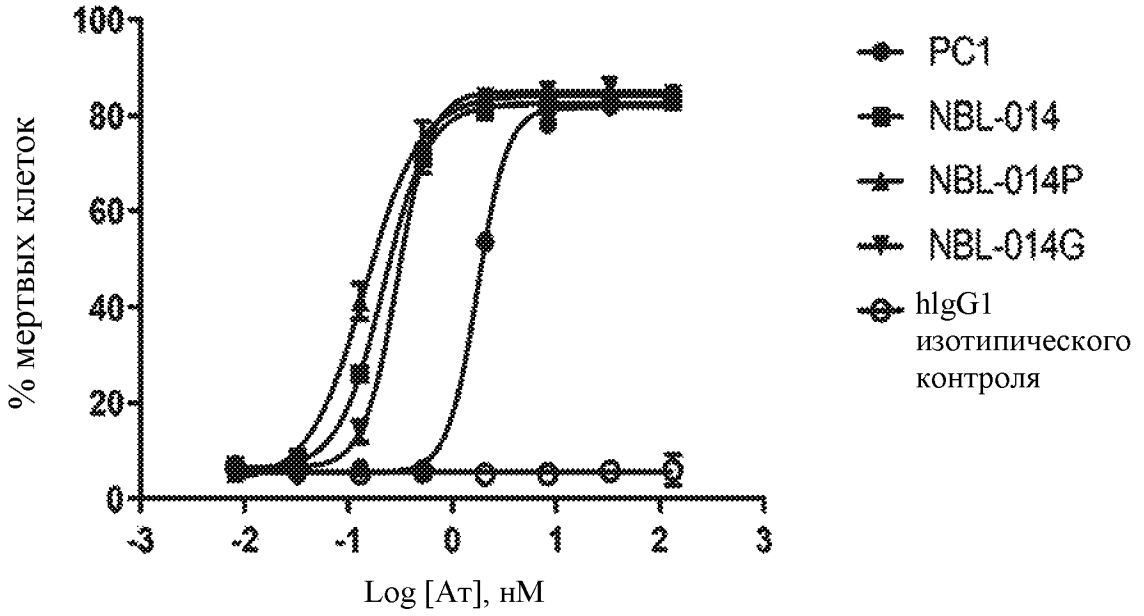


	PC1	NBL-014	NBL-014P	NBL-014G	Изотипический контроль
EC50, нМ	>133	0.4	0.06	0.04	Неактивный

АЗКЦ клеток PATU8988S

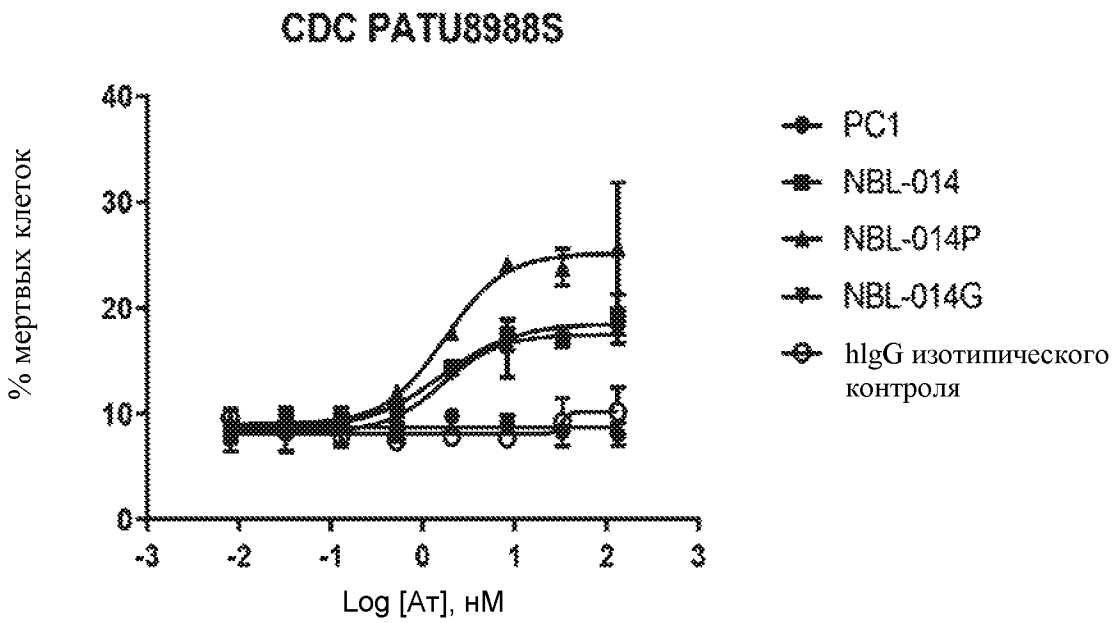
ФИГ. 14B

КЗЦ клеток CHO-Клаудин 18.2



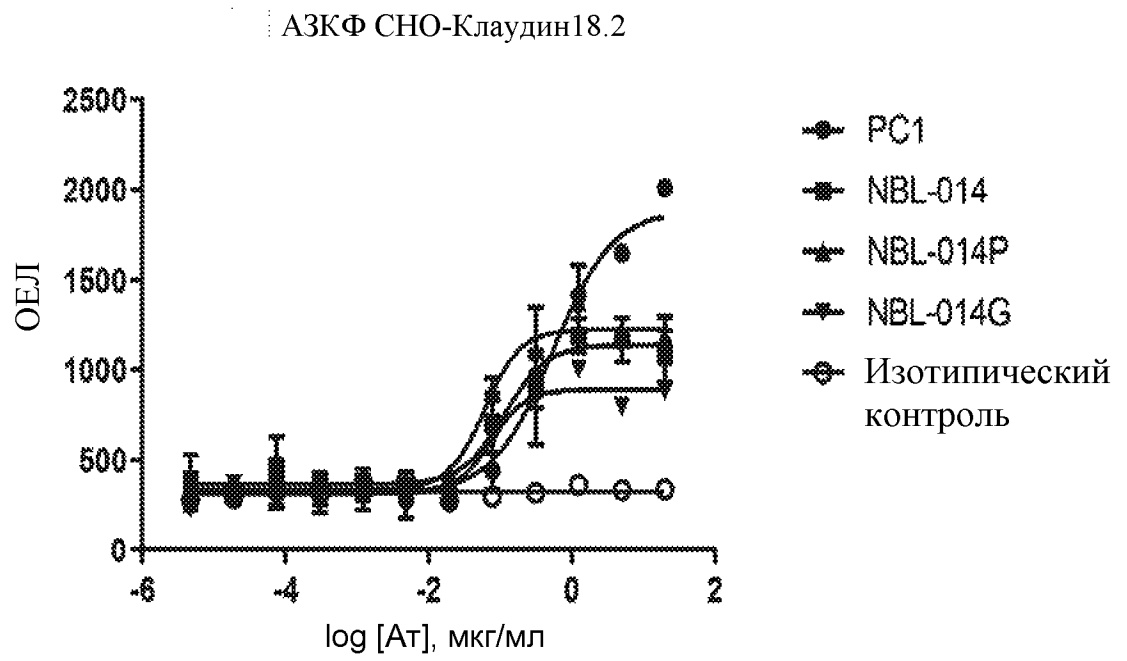
	PC1	NBL-014	NBL-014G	NBL-014P	Изотипический контроль
EC50, нМ	1.76	0.22	0.15	0.30	Неактивный

ФИГ. 15



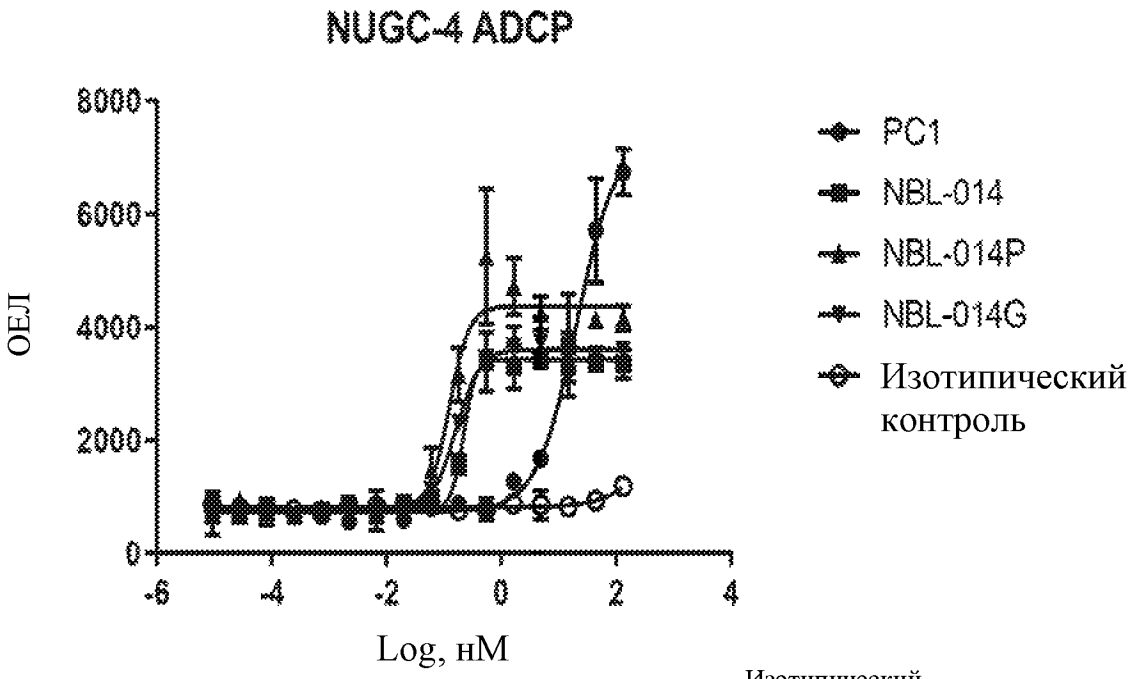
	PC1	NBL-014	NBL-014G	NBL-014P	Изотипи-ческий контроль
EC50, нМ	Неактивный	1.62	1.76	1.67	Неактивный

ФИГ. 16



	PC1	NBL-014	NBL-014P	NBL-014G	Изотипический контроль
EC50, нМ	0.54	0.11	0.06	0.07	Неактивный

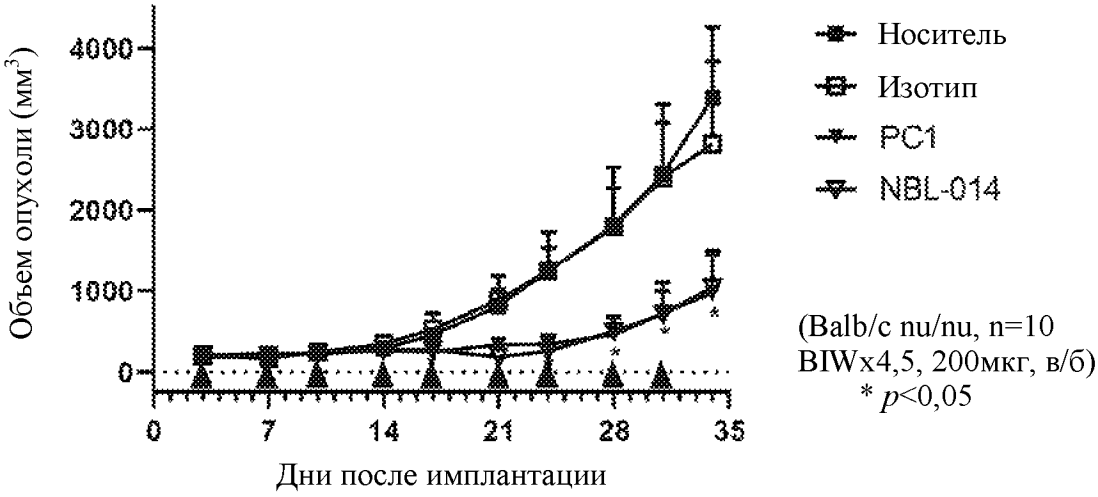
ФИГ. 17А



	PC1	NBL-014	NBL-014P	NBL-014G	Изотипический контроль
EC50, нМ	20.73	0.22	0.13	0.16	Неактивный

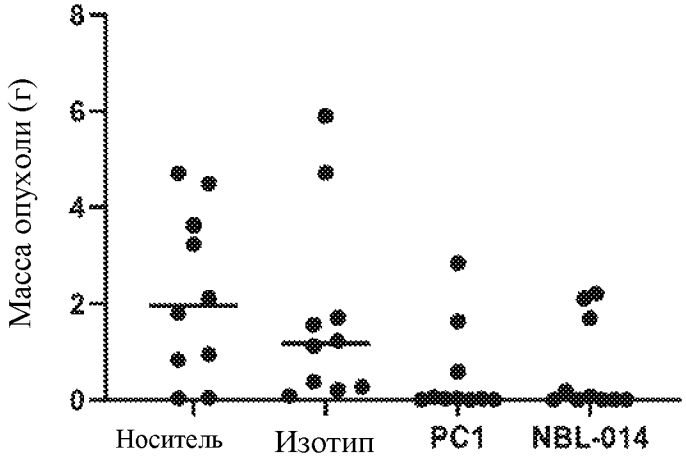
ФИГ. 17B

Объем опухоли PATU8988S-Клаудин 18.2

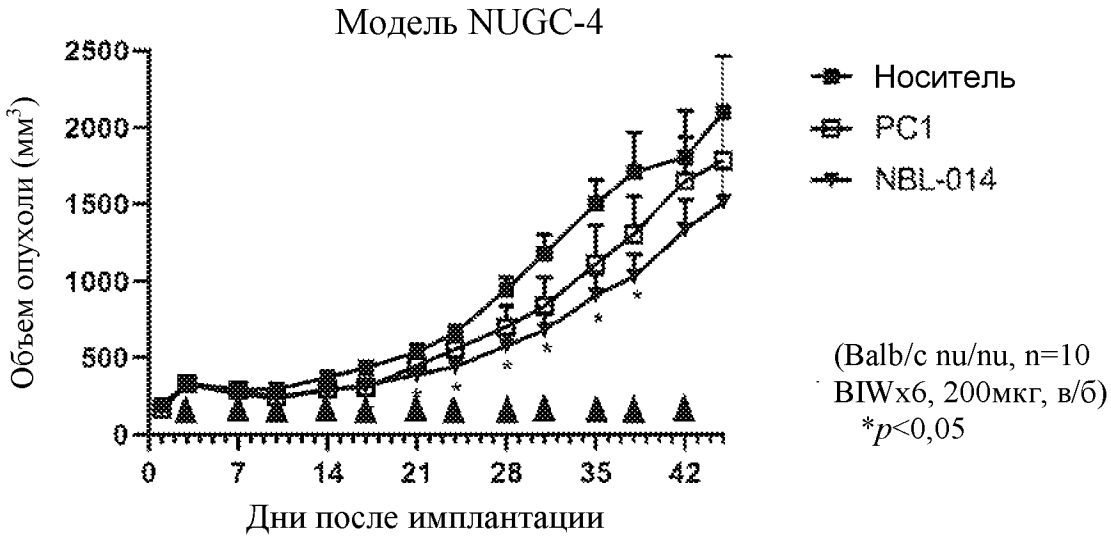


ФИГ. 18A

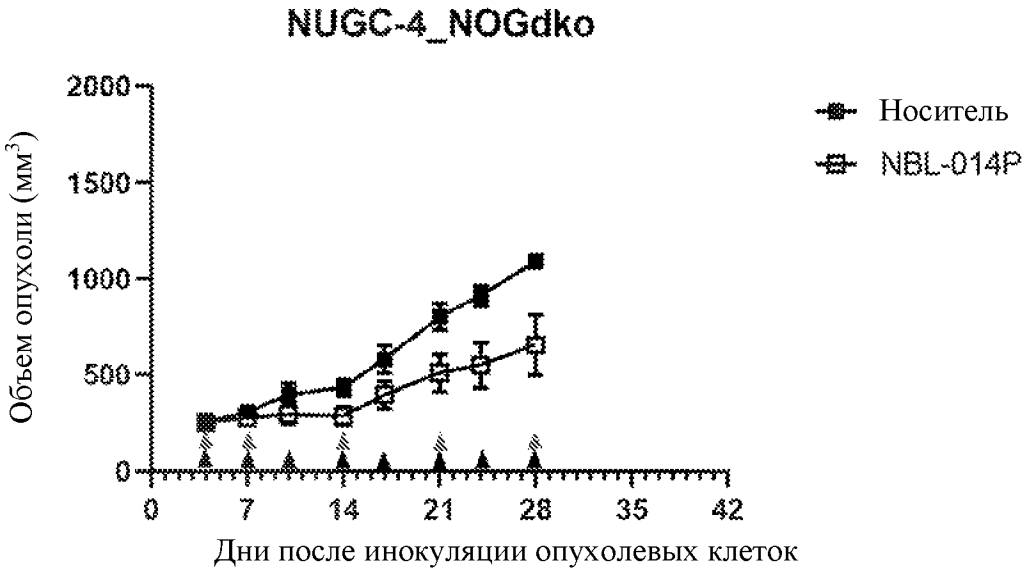
Масса_опухоли_PATU-8988S-Клаудин18.2



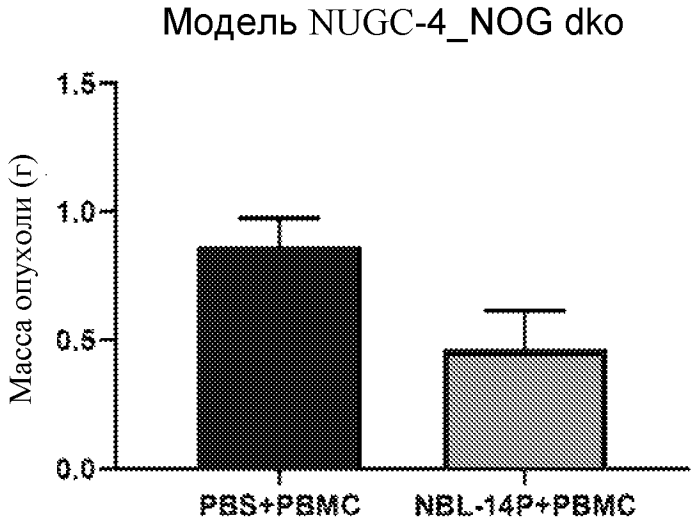
ФИГ. 18B


Модель NUGC-4
Объем опухоли (мм3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни после имплантации
Носитель
PC1
NBL-014
(Balb/c nu/nu, n=10
BIWx6, 200мкг, в/б)
*p<0,05

ФИГ. 19



ФИГ. 20A



ФИГ. 20B

Изоформа 2 клаудина 18 человека, запись Uni-Prot P56856 (CLD18_human) идентифицирована как P56856-2

MAVTACQGLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRE
SSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKA
NMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYT
FGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGF
KASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 329)

Изоформа 1 клаудина 18 человека, запись Uni-Prot P56856 (CLD18_human) идентифицирована как P56856

MSTTTCQVVAFLLSILGLAGCIAATGMDMWSTQDLYDNPVTSVFQYEGLWRSCVRQ
SSGFTECRPYFTILGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKA
NMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYT
FGAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGF
KASTGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 330)

ФИГ. 21