

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041922**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.15

(21) Номер заявки
202092123

(22) Дата подачи заявки
2019.03.06

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/640,288; 62/714,254

(32) 2018.03.08; 2018.08.03

(33) US

(43) 2020.12.09

(86) PCT/US2019/020872

(87) WO 2019/173420 2019.09.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь
(US)**

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

(56) SINGH et al. "Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer," Journal of Hematology & Oncology, 12 May 2017 (12.05.2017), Vol. 10, No. 105, Pgs. 1-5. entire document

US-A1-20150132253

WOLL et al. "Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms," International Journal of Cancer, 16 September 2013 (16.09.2013), Vol. 134, Iss. 3, Pgs. 731-739. entire document

US-A1-20160272711

WO-A1-2016180468

WO-A1-2018006882

JIANG et al. "Claudin 18.2-Specific Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Gastric Cancer," Journal of the National Cancer Institute, 06 September 2018 (06.09.2018), Vol. 111, Iss. 4, Pgs. 409-418. entire document

(57) Описаны антитела против CLDN18.2 и их антигенсвязывающие фрагменты. Описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител и применения антител для лечения или предотвращения заболеваний, таких как злокачественная опухоль и/или воспалительное заболевание.

B1

041922

041922

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США No. 62/640288, поданной 8 марта 2018 г.; и Предварительной патентной заявки США No. 62/714254, поданной 3 августа 2018 г. Полное содержание каждого описания приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против клаудина 18.2 (CLDN18.2), к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Настоящее изобретение относится также к способам получения антител и к способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественные опухоли и воспалительные заболевания и/или ассоциированные осложнения.

Ссылка на список последовательностей, принятый в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "689204.9WO Sequence Listing" и датой создания 26 февраля 2019 г., и имеющий размер 74 кБ. Список последовательностей, принятый через EFS-Web, составляет часть описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Уровень техники для изобретения

Клаудин 18.2 (CLDN18.2), также известный как клаудин-18a2.1, принадлежит к семейству трансмембранных белков клаудина (CLDN), по меньшей мере из 27 изоформ у человека. Клаудины являются главными структурными компонентами плотного контакта между эпителиальными клетками и функционируют как ионные поры для регуляции параклеточной проницаемости катионов и анионов (Sahin et al., *Physiol Rev.* 2013; 93:525-569). Экспрессия CLDN18 в норме ограничена тканями легкого и желудка. CLDN18 имеет два варианта сплайсинга. CLDN18.1 является специфическим для легкого вариантом, в то время как CLDN18.2 является специфическим для желудка вариантом. Варианты сплайсинга отличаются по их N-концевым 69 аминокислотным остаткам из-за альтернативного сплайсинга первого экзона (Niimi et al., *Mol Cell Biol.* 2001; 21:7380-7390). Исследования с использованием мышей с нокаутом CLDN18.2 позволяют предполагать, что CLDN18.2 играет критическую роль в предотвращении подтекания желудочного сока в просвет желудка (Hayash et al., *Gastroenterology* 2012; 142:292-304).

Дисрегуляция экспрессии клаудинов детектирована во многих злокачественных опухолях и может вносить вклад в образование опухолей и инвазивность злокачественных опухолей (Singh et al., *J Oncology* 2010; 2010: 541957). Экспрессия CLDN18.2 увеличена в аденокарциномах протоков поджелудочной железы (PDAC) (Tanaka et al., *J Histochem Cytochem.* 2011; 59:942-952), опухолях пищевода, при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC), при раке яичника (Sahin et al., *Hu Cancer Biol.* 2008; 14:7624-7634), в аденокарциномах желчных протоков (Keira et al., *Virchows Arch.* 2015; 466:265-277) и холангиокарциномах (Shinozaki et al., *Virchows Arch.* 2011; 459:73-80). CLDN18.2 является идеальной мишенью для управляемых с высокой точностью, противораковых биологических средств против положительных по CLDN18.2 опухолей, поскольку CLDN18.2 не экспрессируется ни в одной нормальной ткани, отличной от дифференцированных эпителиальных клеток желудка, которые являются недостижимыми для макромолекулярных соединений, вводимых внутривенно.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают клаудин 18.2 (CLDN18.2).

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CLDN18.2, предпочтительно, CLDN18.2 человека.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CLDN18.2, предпочтительно, CLDN18.2 человека.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 9, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 или 19, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 10, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 или 20.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;
- (e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;
- (f) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12;
- (g) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14;
- (h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16;
- (i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18; или
- (j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CLDN18.2 и является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого фагоцитоза (ADPC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественной опухоли.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

и) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 162, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 165.

Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам специфического нацеливания на CLDN18.2, но не на CLDN18.1, на поверхности клетки злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, она может быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчного протока, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающим культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающим объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение относится также к способам определения уровня CLDN18.2 у субъекта. Способы включают (a) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня CLDN18.2 у субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может, например, представлять собой образец ткани злокачественной опухоли. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец крови.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, так же как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, станет лучше понятным при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1A-1D показано зависимое от дозы связывание очищенных химерных mAb против CLDN18.2 (областей VH и VL мышиных mAb, слитых с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно) с пулом клеток HEK293, стабильно трансфицированных полноразмерным CLDN18.2 человека, по анализу FACS.

На фиг. 2A-2E показано избирательное связывание химерных mAb против CLDN18.2 с CLDN18.2, по сравнению с CLDN18.1. Пулы клеток HEK293, стабильно трансфицированных полноразмерным CLDN18.2 и CLDN18.1 человека, соответственно, использовали в эксперименте. Заштрихованный серый пик является репрезентативным для группы обработки, инкубированной только с вторичным антителом, и незаштрихованный черный пик является репрезентативным для группы обработки, инкубированной как с первичным химерным mAb, так и с вторичным антителом.

На фиг. 3A-3C показаны результаты зависимого от дозы связывания химерных mAb против CLDN18.2 со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2, по анализу FACS.

На фиг. 4А-4J показаны гистограммы связывания химерных mAb против CLDN18.2 со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2. Заштрихованный серый пик является репрезентативным для группы обработки, инкубированной только с вторичным антителом и незаштрихованный черный пик является репрезентативным для группы обработки, инкубированной как с первичным химерным mAb, так и с вторичным антителом.

На фиг. 5А-5G показаны результаты зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb против CLDN18.2 со стабильными пулами HEK293-CLDN18.2, по анализу FACS.

На фиг. 6А-6Е показаны результаты зависимого от дозы связывания гуманизированных mAb против CLDN18.2 со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2, по анализу FACS.

На фиг. 7 показано связывание гуманизированных mAb против CLDN18.2 с линией клеток злокачественной опухоли NUGC-4 при концентрации mAb 685 нМ, по анализу FACS.

На фиг. 8А-8В показаны результаты активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) для пяти гуманизированных mAb против CLDN18.2 и одного химерного mAb против CLDN18.2.

Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае, конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9 мг/мл - 1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1-10% (мас./об.) включает 0,9-11% (мас./об.). В рамках изобретения, использование числового значения явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие таким композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включительному или, а не к исключительному или. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоя-

щий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном "состоит из" или варианты, такие как "в основном состоят из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно, человека.

Термины "справа", "слева", "ниже" и "выше" обозначают направления на чертежах, на которые сделана ссылка.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не является точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклонения, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела против CLDN18.2 и кодирующие их полинуклеотиды, полипептиды CLDN18.2 и кодирующие их полинуклеотиды CLDN18.2), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности(последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), посредством компьютеризированных осуществлений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или посредством визуальной проверки (см., в общем, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al, выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда > 0) и N (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей, оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение X от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже, из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=(-4)$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова (W) 3 и ожидание (E) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, кодированного второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

Антитела.

Изобретение, в общем, относится к выделенным антителам против CLDN18.2, нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Изобретение относится к способам получения антител и способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль и воспалительные заболевания. Антитела по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, но без ограничения, высокоаффинное связывание с CLDN18.2, высокую специфичность для CLDN18.2, способность стимулировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC) против клеток, экспрессирующих CLDN18.2, и способность ингибировать рост опухоли у субъектов и в моделях на животных, при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии.

В общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CLDN18.2.

В рамках изобретения, термин "антитело" используют в широком смысле, и он включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белковые или пептидные цепи, имеющие специфичность связывания для специфического антигена. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно приписать к пяти главным классам (т.е., IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подклассифицируют как изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут принадлежать к любому из пяти главных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител из видов позвоночных можно приписать к одному из двух явно отличающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е., определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи, альтерна-

тивно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В рамках изобретения, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое является в основном свободным от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает CLDN18.2, является в основном свободным от антител, которые не связывают CLDN18.2). Кроме того, выделенное антитело является в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В рамках изобретения, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению можно получать посредством способа гибридомы, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов из отдельных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, например, такому как диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидным мостиком фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидным мостиком диатело (ds диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент является способным связываться с тем же самым антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и фрагмент Fd тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к общепринятому в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом из от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот. В рамках изобретения, термин "однодоменное антитело" относится к общепринятому в данной области однодоменному антителу, которое содержит варибельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, или которое содержит только варибельную область тяжелой цепи.

В рамках изобретения, термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "гуманизированное антитело" относится к не относящемуся к человеку антителу, модифицированному для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела, таким образом, чтобы антигенсвязывающие свойства антитела сохранялись, но его антигенность в организме человека уменьшалась.

В рамках изобретения, термин "химерное антитело" относится к антителу, где аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей, часто соответствует варибельной области антитела, происходящего из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, происходящим из другого вида животного (например, человека), чтобы исключить вызов иммунного ответа у этого вида.

В рамках изобретения, термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему множество последовательностей варибельного домена иммуноглобулина, где последовательность первого варибельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность второго варибельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или в основном не перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпи-

топы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела, или молекулу тетраспецифического антитела.

В рамках изобретения, термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, связывающему не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательностью второго вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый эпитоп локализован на CLDN18.2, и второй эпитоп локализован на PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD3, CD73, CD47, TIG-1, апелине, DLL3, рецепторе фолата альфа и/или других опухолеассоциированных иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

Как применяют в настоящем документе, термин "CLDN18.2" относится к варианту 2 клаудина 18, клаудину-18.2 или клаудину-18a2.1, который принадлежит к семейству трансмембранных белков клаудина. CLDN18.2 специфически экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток в желудке (Niimi et al., Mol Cell Biol. 2001; 21:7380-7390) и становится одним из главных структурных компонентов плотного контакта между эпителиальными клетками (Sahin et al., Physiol Rev. 2013; 93:525-569). Термин "CLDN18.2 человека" относится к CLDN18.2, происходящему из человека. Иллюстративная аминокислотная последовательность CLDN18.2 человека представлена под No. доступа в GenBank AAL15637.1 (SEQ ID NO: 141).

В рамках изобретения, антитело, которое "специфически связывает CLDN18.2", относится к антителу, которое связывает CLDN18.2, предпочтительно, CLDN18.2 человека, с KD 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно, 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин " KD " относится к константе диссоциации, которая получена из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражена как молярная концентрация (М). Значения KD для антитела можно определять с использованием принятых в данной области способов, в свете настоящего описания. Например, KD антитела можно определять с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы биосенсора, например, системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоя, например, системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CLDN18.2, предпочтительно, CLDN18.2 человека.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CLDN18.2, предпочтительно, CLDN18.2 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 9, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 или 19, или вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 10, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 или 20. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO: 9, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 или 19, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95, 96, 97, 98 или 99%, идентичную SEQ ID NO: 10, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 или 20, соответственно.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- a. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;
- b. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- c. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- d. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;
- e. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;
- f. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12;
- g. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14;
- h. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16;
- i. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18;
- j. вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20.

о) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 158;

р) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 159, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 163;

q) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 159, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 164;

г) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 160, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 163;

с) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 160, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 164;

т) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 161, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 165; или

и) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 162, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 165.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что кодирующую последовательность белка можно изменять (например, заменять, deletировать, вставлять и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалисту в данной области в свете настоящего описания, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный экспрессирующий вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для осуществления общепринятой функции экспрессирующего вектора, например, промотор, элемент для связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессирующих векторов, способных к доставке нуклеиновых кислот в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем описании для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Общеизвестные способы клонирования или искусственный синтез генов можно использовать для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любую клетку-хозяина, известную специалисту в данной области в свете настоящего описания, можно использовать для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантным экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева общепринятыми способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрирует в геном клетки-хозяина, таким образом, чтобы рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессировалась.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми способами, известными в данной области, и как описано в настоящем описании.

Фармацевтические композиции.

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вы-

деленное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения обозначает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения, термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав, как правило, содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60, 70, 75, 80, 85, 90, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическую композицию можно составлять в инъекционной форме, которую можно вводить, например, посредством устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в стекловидное тело или внутримышечно.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую терапевт или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или покрытые таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы).

Фармацевтическая композиция может также находиться в форме, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для разведения.

Лекарственные формы могут иметь немедленное высвобождение, в этом случае, они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, в этом случае, они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или подъязычно.

pH в водном составе может составлять между pH 3 и 10. В одном варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, виннокаменную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан, и их смеси. Буфер может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензэтония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтanol, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может быть представлен индивидуально или в комбинации, в

концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит изотоническое средство. Неограничивающие примеры варианта осуществления включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического средства включает сахар. Неограничивающие примеры Сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксипропилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического средства является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяют как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН-группу. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотоническое средство может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ, и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксипропилцеллюлозу и ее производные (такие как HPC, HPC-SL, HPC-L и HPMS), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такие как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), содержащие серу вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующих вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, состоящим из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, например, таких как ЭДТА и/или соль бензамидина и соляной кислоты (HCl). Ингибитор протеазы может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы применения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу нацеливания на CLDN18.2 на поверхно-

сти клетки злокачественной опухоли у субъекта для достижения уничтожения клетки, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CLDN18.2, или фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Связывание моноклонального антитела против CLDN18.2 или антигенсвязывающего фрагмента с CLDN18.2 может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), или другие эффекты, приводящие к гибели подвергнутой нацеливанию клетки злокачественной опухоли. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, служить для привлечения конъюгированных лекарственных средств и/или может формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом, чтобы опосредовать гибель подвергнутой нацеливанию клетки злокачественной опухоли.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CLDN18.2, можно характеризовать посредством способов, известных в данной области, и как описано в настоящем описании. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CLDN18.2, включают, но без ограничения, анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA и OctetRed, и детекцию связывания антител и их антигенсвязывающих фрагментов с CLDN18.2 на клетках (либо клетках, трансфицированных CLDN18.2, либо клетках, естественным образом экспрессирующих CLDN18.2), посредством FACS. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CLDN18.2, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CLDN18.2, или фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может, например, быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчного протока, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CLDN18.2, или фармацевтической композиции по изобретению.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела против CLDN18.2 или его антигенсвязывающего фрагмента. В рамках изобретения, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, вызывающему желательный биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом, применительно к поставленной цели.

В рамках изобретения, применительно к антителам против CLDN18.2 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против CLDN18.2 или его антигенсвязывающего фрагмента, модулирующее иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта. Также, в рамках изобретения, применительно к антителам против CLDN18.2 или их антигенсвязывающих фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против CLDN18.2 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, ассоциированные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой злокачественную опухоль, предпочтительно, злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчного протока, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количест-

во относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (xi) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозу можно менять, в соответствии с различными факторами, такими как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, общее состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем описании, составляют, чтобы они являлись пригодными для намеченного способа введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять, чтобы они являлись пригодными для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к злокачественной опухоли и/или воспалительному заболеванию, нарушению или состоянию, который, необязательно, является различимым у субъекта, но может являться различимым у субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно, злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, используемым для лечения злокачественной опухоли и/или воспалительного заболевания, нарушения или состояния. Для терапии злокачественной опухоли, представленные композиции можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но без ограничения, химиотерапию, mAb против CD20, mAb против TIM-3, mAb против LAG-3, mAb против EGFR, mAb против HER-2, mAb против CD19, mAb против CD33, mAb против CD47, mAb против CD73, mAb против DLL-3, mAb против апелина, mAb против TIP-1, mAb против FOLR1, mAb против CTLA-4, mAb против PD-L1, mAb против PD-1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенное средство, радиотерапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленную терапию или другие противораковые лекарственные средства. Антитела против CLDN18.2 можно использовать для конструирования биспецифических антител с партнерами - mAb против PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, CD47, CD3, апелина, DLL-3, TIP-1, рецептора фолата альфа (FOLR1) и/или других антигенов поверхности опухолей, для лечения злокачественных опухолей/опухолей, экспрессирующих как CLDN18.2, так и специфический опухолеассоциированный антиген.

В рамках изобретения, термин "в комбинации", в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к использованию более одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, композицию, описанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5

недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часа, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второго терапевтического средства субъекту.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу определения уровня CLDN18.2 у субъекта. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня CLDN18.2 у субъекта.

В рамках изобретения, "образец" относится к биологическому образцу, выделенному от субъекта, и может включать, но без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биоптаты ткани (например, ткани злокачественной опухоли), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слезу, мокроту, пот, мочу или любой другой продукт секреции, экскреции, или другие физиологические жидкости. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму.

В конкретных вариантах осуществления, уровень CLDN18.2 у субъекта можно определять с использованием анализов, выбранных, но без ограничения, из анализа Вестерн-блоттинга, иммуногистохимии (ИHC) и анализа ELISA. Относительные уровни белка можно определять с использованием анализа Вестерн-блоттинга и ИHC, и абсолютные уровни белка можно определять с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней CLDN18.2, уровни CLDN18.2 можно определять в сравнении между по меньшей мере двумя образцами, например, между образцами от одного и того же субъекта в различных временных точках, между образцами из различных тканей одного и того же субъекта и/или между образцами от различных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней CLDN18.2, например, посредством анализа ELISA, абсолютный уровень CLDN18.2 в образце можно определять посредством получения стандарта для анализа ELISA до тестирования образца. Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения уровня CLDN18.2 в образце от субъекта с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Использование способов определения уровня CLDN18.2 в образце от субъекта может приводить к диагностике аномальных (увеличенных, уменьшенных или недостаточных) уровней CLDN18.2 при заболевании и к принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может быть выбрано, но без ограничения, из злокачественной опухоли и/или воспалительного заболевания. Кроме того, посредством мониторингирования уровней CLDN18.2 у субъекта, риск развития заболевания, как указано выше, можно определять на основании знаний об уровне CLDN18.2 при конкретном заболевании и/или в ходе прогрессирования конкретного заболевания.

Варианты осуществления

Изобретение относится также к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из

- (1) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает клаудин 18.2 (CLDN18.2), предпочтительно, специфически связывает CLDN18.2 человека.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;

- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; или
- (10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает клаудин 18.2 (CLDN18.2), предпочтительно, специфически связывает CLDN18.2 человека.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1 или 2, содержащие вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 9, 1, 3, 5, 7, 11, 13, 15, 17 или 19, или вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 10, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 или 20.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1 или 2, содержащие

(a) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;

(b) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;

(c) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;

(d) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;

(e) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;

(f) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12;

(g) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14;

(h) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16;

(i) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18;

(j) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20.

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 7, где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 142, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 144;

b) вариabельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 142, и вариabельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

(ADCC), антителозависимого фагоцитоза (ADPC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим mAb или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-9.

Вариант осуществления 11 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 10.

Вариант осуществления 12 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор из варианта осуществления 11.

Вариант осуществления 13 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ нацеливания на CLDN18.2 на поверхности клетки злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 13.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 13.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ из варианта осуществления 15, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчного протока, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 13.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента из любого из вариантов осуществления 1-9, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-9, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ определения уровня CLDN18.2 у субъекта, включающий:

- а) получение образца от субъекта;
- б) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом из любого из вариантов осуществления 1-9; и
- с) определение уровня CLDN18.2 у субъекта.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ из варианта осуществления 20, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ из варианта осуществления 21, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ из варианта осуществления 20, где образец представляет собой образец крови.

Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против CLDN18.2.

Мышей иммунизировали клетками, экспрессирующими экзогенный CLDN18.2 человека, и титр в плазме определяли посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS). Спленоциты собирали и сливали с линией клеток миеломы для получения гибридом. Гибридомы рассевали в 384-луночные планшеты, и супернатанты из индивидуальных лунок подвергали скринингу посредством FACS с использованием клеток HEK293, экспрессирующих CLDN18.2. Положительные клоны подвергали контрскринингу против CLDN18.1 человека, экспрессируемого на клетках HEK293, посредством

FACS. Наилучшие положительные клоны выделяли и секвенировали.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для моноклональных антител против CLDN18.2 представлены в табл. 1 и 2, и области CDR для моноклональных антител против CLDN18.2 представлены в табл. 3-6.

Таблица 1. Последовательности переменных областей тяжелой цепи для mAb против CLDN18.1

клоны mAb	VH	SEQ ID NO:
2-C3	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTSSYGMSWVRQTPDKRLE WVATISGGGSYTYLDSVKGRFTISRDIKNTLYLQMSSLKSEDTAM YFCARQSRGNAMDYWGQGTSTVTVSS	1
2-P8	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYSTGYNMHWVKQSHGKSL EWIGYIDPYNGVTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYVQLNSLTSEDSA YYCARWGNGYVDYWGQGTTLKVSS	3
3-E21	EVQLVESGGALVKPGGSLKLSAASGFTFSKYAMSWVRQTPDKRLE WVAFISNGGSYTYCLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDTAL YYCARHDKGNALDYWGQGNSTVTVSS	5
3-P21	EIQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSTGYNMHWVKQSHGKSL WIGNINPYFGSTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YYCARGAYYGNAMDYWGQGTSTVTVSS	7
5-E22	KVQLQQSGPDLVEPGASVKISCKASGYTITDNYMHWVKQKPGQGLE WIGEYIPGSGNTYYNERFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCARGFPYYAMDYWGPGTSTVTVSS	9
6-J11	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFIFSSFGMHVWRQAPKGL WVAIISGRSTMYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAM YYCARGGFYGNSLDYWGQGTSTVTVSS	11
8-G12	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSDYWMNWVKQRPKGGL EWIGQIYPGYGDTKYNNFKGTATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA YFCARWGGYGNAMDYWGQGTSTVTVSS	13
10-J10	QVQLQQPGAEVLKPGASVKLSCKASGYTFTRYRMNWVKQRPQGGL EWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VFYCARLNYGNCDFDYWGQGTTLTVSS	15
10-K2	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYAFTSYVMHWVKQKPGQGL EWIGYINPYSDGTRYNEFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAV YYCTRIYYGNAMDYWGQGTSTVTVSS	17
15-D6	QVQLQQPGADLVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGGL WIGNIYPGRSSTNYNEFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLASDDSAV YYCSRLSRGNAMDYWGQGTSTVTVSS	19

VH: переменная область тяжелой цепи.

Таблица 2. Последовательности переменных областей легкой цепи для mAb против CLDN18.1

клоны mAb	VL	SEQ ID NO:
2-C3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYSYPLTFGAGTKLELK	2
2-P8	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLSWFQKPGKSPKTLI YRANRLVDGVPDRFSGSFGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPL TFGAGTKLELK	4
3-E21	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLSVYYCQ NDYFYPLTFGAGTKLELK	6
3-P21	DIVMTQSPSSLTVTAGGKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYFYPLTFGAGTKLELK	8
5-E22	DIQMNQSPSSLSASLGDITITCHARQNNVWLSWYQKSGNIPKLLIY KASNLHTGVPSRFSGSGSTRFTLTISLQPEDMATYYCQGGQNYPLT FGGGTKLEIK	10
6-J11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSLSLLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISMQAEDLAVYSCQ NAYSYPPLTFGAGTKLELK	12
8-G12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQTEDLAIIYQCQ AYIYPLTFGAGTKLELK	14
10-J10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQTLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVFYCQ NDYFYPTFGSGTKLEIK	16
10-K2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYSYPPTFGSGTKLEIK	18
15-D6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCRSSQSLNSGNQKSYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQ NDYYYPTFGSGTKLEIK	20

VL: переменная область легкой цепи.

Таблица 3. Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против CLDN18.2

клоны mAb	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
2-C3	GFTFSSYG	21	ISGGGSYT	22	ARQSRGNAMDY	23
2-P8	GYSFTGYN	24	IDPYNGVT	25	ARWGGNYVDY	26
3-E21	GFTFSKYA	27	ISNGGSYT	28	ARHDKGNALDY	29
3-P21	GYSFTGYN	30	INPYFGST	31	ARGAYYGNAMDY	32
5-E22	GYTITDNY	33	IYPGSGNT	34	ARGFPYYAMDY	35
6-J11	GFIFSSFG	36	ISSGRSTM	37	ARGGFYGNSLDY	38
8-G12	GYAFSDYW	39	IYPGYGDT	40	ARWGYYGNAMDY	41
10-J10	GYTFTRYR	42	IDPSDSET	43	ARLNYGNCFDY	44
10-K2	GYAFTSYV	45	INPYSDGT	46	TRIYYGNAMDY	47
15-D6	GYTFTSYW	48	IYPGRSST	49	SRLSRGNAMDY	50

HC: тяжелая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

ID: SEQ ID NO.

HC CDR для mAb против CLDN18.2 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4. Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против CLDN18.2

клоны mAb	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
2-C3	QSLNSGNQKNY	51	WAS	52	QNDYSYPLT	53
2-P8	QDINRY	54	RAN	55	LQYDEFPLT	56
3-E21	QSLNSGNQKNY	57	WAS	58	QNDYFYPLT	59
3-P21	QSLNSGNQKNY	60	WAS	61	QNDYFYPLT	62
5-E22	QNINWV	63	KAS	64	QQGQNYPLT	65
6-J11	LSLLNSGNQKNY	66	WAS	67	QNAYSYPLT	68
8-G12	QSLNSGNQKNY	69	WAS	70	QNAYIYPLT	71
10-J10	QTLNSGNQKNY	72	WAS	73	QNDYFYPLT	74
10-K2	QSLNSGNQKNY	75	WAS	76	QNDYSYPFT	77
15-D6	QSLNSGNQKSY	78	WAS	79	QNDYYPFT	80

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

NO: SEQ ID NO.

LC CDR для mAb против CLDN18.2 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5. Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против CLDN18.2

клоны mAb	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
2-C3	GFTFSSYGM S	81	TISGGGSYTYLDSV KG	82	ARQSRGNAMD Y	83
2-P8	GYSFTGYNM H	84	YIDPYNGVTNYNQK FKG	85	ARWGGNYVDY	86
3-E21	GFTFSKYAM S	87	FISNGGSYTYCLDSV KG	88	ARHDKGNALDY	89
3-P21	GYSFTGYNM K	90	NINPYFGSTNYNQKF KG	91	ARGAYYGNAM DY	92
5-E22	GYTITDNYM H	93	EIYPGSGNTYYNERF KG	94	ARGFPYYAMDY	95
6-J11	GFIFSSFGMH	96	YISSGRSTMYADT VKG	97	ARGGFYGNSLD Y	98
8-G12	GYAFSDYW	99	QIYPGYGDTKYEN	100	ARWGYYGNAM	101
	MN		FKG		DY	
10-J10	GYTFTRYRM N	102	NIDPSDSETHYNQKF KD	103	ARLNYGNCFDY	104
10-K2	GYAFTSYVM H	105	YINPYSDGTRYNEKF KG	106	TRIYYGNAMDY	107
15-D6	GYTFTSYWI N	108	NIYPGRSSTNYNEKF KS	109	SRLSRGNAMDY	110

HC: тяжелая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

NO: SEQ ID NO.

HC CDR для mAb против CLDN18.2 определяли с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 6. Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против CLDN18.2

клоны mAb	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
2-C3	KSSQSLNSGNQKNYLT	111	WASTRES	112	QNDYSYPLT	113
2-P8	KASQDINRYLS	114	RANRLVD	115	LQYDEFPLT	116
3-E21	KSSQSLNSGNQKNYLT	117	WASTRES	118	QNDYFYPLT	119
3-P21	KSSQSLNSGNQKNYLT	120	WASTRES	121	QNDYFYPLT	122
5-E22	HARQNINWLS	123	KASNLHT	124	QQGQNYPLT	125
6-J11	KSSSLNSGNQKNYLT	126	WASTRES	127	QNAYSYPPLT	128
8-G12	KSSQSLNSGNQKNYLT	129	WASTRES	130	QNAYIYPLT	131
10-J10	KSSQTLNSGNQKNYLT	132	WASTRES	133	QNDYFYPPFT	134
10-K2	KSSQSLNSGNQKNYLT	135	WASTRES	136	QNDYSYPFT	137
15-D6	RSSQSLNSGNQKSYLT	138	WASTRES	139	QNDYYPFT	140

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

NO: SEQ ID NO.

LC CDR для mAb против CLDN18.2 определяли с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Пример 2. Продукция и очистка mAb из культуральных сред от трансфицированных клеток 293E.

Для получения рекомбинантных химерных mAb против CLDN18.2, экспрессирующими векторами, содержащими мышинные вариабельные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно, временно трансфицировали клетки 293E. Рекомбинантные антитела, продуцированные в суспензии клеток 293E, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком A.

Пример 3. Анализ FACS связывания очищенных антител против CLDN18.2.

Клетки HEK293, стабильно трансфицированные полноразмерным CLDN18.2 человека, переносили в 96-луночный планшет. Приблизительно 50000 клеток инкубировали с очищенными химерными mAb против CLDN18.2 (вариабельные области мышинных mAb, слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно) в различных концентрациях в течение 15 минут на льду. В некоторых случаях, использовали 100000 клеток на лунку. Затем клетки центрифугировали в течение 5 минут и промывали один раз с использованием буфера для FACS (HBSS, дополненного 0,1% BSA и 0,05% азидом натрия). Затем клетки инкубировали с конъюгированными с FITC поликлональными антителами козы против IgG человека (Thermo Fisher, кат. #: H10301) и инкубировали на льду в течение следующих 15 минут. Затем клетки промывали с использованием буфера для FACS один раз и ресуспендировали в буфере для FACS. Затем клетки пропускали через Attune NxT, и данные анализировали посредством программного обеспечения Attune NxT. Данные FACS выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Связывание химерных mAb против CLDN18.2 с клетками HEK293, стабильно трансфицированными полноразмерным CLDN18.2 человека (стабильным пулом клеток), анализировали посредством FACS. Результаты зависимо от дозы связывания представлены на фиг. 1A-1D. Связывание химерных mAb против CLDN18.2 с клетками HEK293, стабильно трансфицированными полноразмерным CLDN18.2 и CLDN18.1 человека (стабильными пулами клеток), соответственно, оценивали с использованием 10 нМ mAb с использованием FACS. Результаты анализа FACS связывания представлены на фиг. 2A-2E. Данные показывают, что эти mAb специфически связываются с CLDN18.2 и не связываются с CLDN18.1.

Химерные mAb против CLDN18.2 анализировали также с использованием стабильной линии клеток HEK293, экспрессирующей полноразмерный CLDN18.2 человека (HEK293-CLDN18.2), с использованием FACS, как описано выше, за исключением того, что конечную стадию детекции проводили с использованием F(ab')₂ козы против Fc IgG человека, конъюгированного с Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, кат. #: H10120). Результаты анализа FACS зависимо от дозы связывания химерных mAb против CLDN18.2 со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2 представлены на фиг. 3A-3C. Гистограмма связывания каждого химерного mAb при 7,6 нМ со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2 показана на фиг. 4A-4J. Эти данные показывают, что химерные mAb специфически связываются со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2.

Пример 4. Гуманизация mAb против CLDN18.2.

Мышинные mAb против CLDN18.2 2-C3, 5-E22, 6-J11, 3-E21 и 3-P21 гуманизировали для уменьшения потенциала иммуногенности при использовании у пациентов-людей. Последовательности вариабельных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческого антитела в базе данных Protein Data Bank (PDB) и строили модели гомологии. CDR как в тяжелых, так и в легких цепях мышинных mAb прививали в человеческие каркасы, имеющие наивысшую возможность поддержания надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. Обратные мутации от человеческих остатков до мышинного остатка или другие мутации конструировали при необходимости. Последовательности гуманизированных областей VH и VL показаны в табл. 7.

Гуманизированные области VH и VL сливали с константными областями тяжелой цепи IgG1 и лег-

кой цепи каппа человека, соответственно. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции в клетках 293E или CHO, и очищенные mAb анализировали по их способности связываться с клетками HEK293, стабильно трансфицированными полноразмерным CLDN18.2 человека, с использованием FACS. Значения EC_{50} для гуманизированных mAb для связывания с CLDN18.2 при использовании стабильного пула HEK293-CLDN18.2 обобщены в табл. 8.

Результаты зависимость от дозы связывания гуманизированных mAb со стабильным пулом HEK293-CLDN18.2 показаны на фиг. 5A-5G. Детекцию на основе FITC использовали в экспериментах FACS в табл. 8 и на фиг. 5A-5C; детекцию на основе Alexa Fluor® 488 использовали в экспериментах FACS на фиг. 5D-5G.

Результаты зависимости от дозы связывания гуманизированных mAb против CLDN18.2 со стабильной линией клеток HEK293-CLDN18.2 по анализу FACS показаны на фиг. 6A-6E. Связывание гуманизированных mAb против CLDN18.2 с линией клеток злокачественной опухоли NUGC-4 при концентрации mAb 685 нМ также анализировали посредством FACS. Результаты связывания NUGC-4 гуманизированными mAb показаны на фиг. 7. Детекцию на основе Alexa Fluor® 488 использовали в экспериментах на фиг. 6A-6E и 7.

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) mAb измеряли с использованием набора ADCC Reporter Bioassay Core Kit (Promega, кат. #: G7010), в соответствии с протоколом, представленным производителем. Кратко, приблизительно 12500 клеток HEK293-CLDN18.2 на лунку смешивали с различными концентрациями тестируемых антител в буфере для анализа ADCC в 96-луночном микропланшете с половинным объемом лунок (Corning-Costar, кат. #: 3696). Затем, приблизительно 37500 на лунку клеток ADCC Bioassay Effector cells добавляли до конечного объема 37,5 мкл и перемешивали. Планшет инкубировали при 37°C в течение 6 часов без встряхивания. Для измерения активности люциферазы, 12,5 мкл смеси для анализа удаляли из каждой лунки и добавляли 25 мкл реагента для анализа люциферазы Bio-Glo. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут с встряхиванием. 30 мкл смеси на лунку переносили в белый планшет (BRAND, кат. #: 781621) для измерения люминесценции в многорежимном считывателе для планшетов EnVision 2102. Результаты для активности ADCC пяти гуманизированных mAb и одного химерного mAb показаны на фиг. 8A-8B. RLU, относительные световые единицы.

Таблица 7. Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированных mAb против CLDN18.2

VH/VL	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
2-C3-H1	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTASGFTFSSYGMSWVRQPPGKALEW VATISGGGSYTYNPSLKDRTISRDISANQLVLKVTNMDPADTATYF	142

	CARQSRGNAMDYWGQGTTVTVSS	
2-C3-H2	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFTFSSYGMWSIRQPPGKALEWL ATISGGGSYTYLDSLKDRFTISRDISKNQVVLTVTNMDPADTATYFC ARQSRGNAMDYWGQGTTVTVSS	143
2-C3-L1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG KAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDDEFATYYCQN DYSYPLTFGGGKVEIK	144
2-C3-L2	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG KAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQN DYSYPLTFGGGKVEIK	145
5-E22-H1	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTITDNYMHWVRQAPGQGL EWIGEIPGSGNTYFNEKFKNRATLTADKSTTTAYMELKSLQFDDTA VYFCARGFPYYAMDYWGQGTTVTVSS	146
5-E22-H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTITDNYMHWVRQAPGQGL EWIGEIPGSGNTYYAEKFKNRATLTADKSISTAYMELSLRSLRSDDTAV YFCARGFPYYAMDYWGQGTTLTVTVSS	147
5-E22-L1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCHARQINNVWLSWYQQKPGQAPRLLI YKASNLHTGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGQNYPL TFGGGKVEIK	148
5-E22-L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHARQINNVWLSWYQQKPGQAPRLLI YKASNLHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGQNYPLT FGGGKVEIK	149
5-E22-L3	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCHARQINNVWLSWYQLKPGQSPQLLI YKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQGQNYPL LTFGGGKVEIK	150
6-J11-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPGKGLEW VAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLTAEDTAVY YCARGGFYGNLDYWGQGTTLTVTVSS	151
6-J11-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPGKGLEW VAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAVY YCARGGFYGNLDYWGQGTTLTVTVSS	152
6-J11-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG KAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYSCQN AYSYPPLTFGGGKVEIK	153
3-E21-H1	QVQLQESGPGIVRPSQTLSTCTASGFTFSKYAMNWVRQPPGRGLEW VAFISNGGSYTEYNPSVKGRFTILRDNSKNQLSLRLSSVTAADTAVYY CARHDKGNALDYWGQGSLLTVTVSS	154
3-E21-H2	QVQLQESGPGIVRPSQTLSTCTASGFTFSKYAMNWVRQPPGRGLEW AFISNGGSYTEYNPSVKGRFTILRDNSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCA RHDKGNALDYWGQGSLLTVTVSS	155
3-E21-H3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAPGKGLE WVAAISNGGSYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARHDKGNALDYWGQGTTLTVTVSS	156
3-E21-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG APKLLIYWASNLQTVPSRFSGSGSGTDFTTISLQPEDFATYYCQND YFYPLTFGGGKVEIK	157
3-E21-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQN DYFYPLTFGGGKTRLEIK	158
3-P21-H1	EIQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYNIHWVRQAPGKGLEW GYINPYFGSTYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARGAYYGNAMDYWGQGTTLTVTVSS	159
3-P21-H2	EIQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYNmKWVRQAPGKGLEW IGNINPYFGSTYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARGAYYGNAMDYWGQGTTLTVTVSS	160
3-P21-H3	EIQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSTGYNIGWVRQMPGKGLEW IGIINPYFGSTRYSPSFQGGATLSVDKSKNTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGAYYGNAMDYWGQGTTLTVTVSS	161
3-P21-H4	EIQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSTGYNmKWVRQMPGKGLEW IGIINPYFGSTYSPSFQGGATLSVDKSKNTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGAYYGNAMDYWGQGTTLTVTVSS	162
3-P21-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLNLSGNQKNYVTWYQQKPG KAPKLLIYWASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQN DYFYPLTFGGGKVEIK	163
3-P21-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLNLSGNQKNYVTWYQQKPG KAPKLLIYWASSTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQND YFYPLTFGGGKVEIK	164
3-P21-L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQN DYFYPLTFGGGKVEIK	165

Таблица 8. Значения EC_{50} для гуманизированных mAb для связывания CLDN18.2 с использованием стабильного пула HEK293-CLDN18.2

Наименование	EC_{50} (нМ)
2-C3-H1L1	9,8
2-C3-H1L2	9,1
2-C3-H2L1	8,8
2-C3-H2L2	8,0
5-E22-H1L1	59,0
5-E22-H1L2	258,6
5-E22-H1L3	61,0
5-E22-H3L1	12,1
5-E22-H3L2	19,4
5-E22-H3L3	14,7
6-J11-H1L1	11,2
6-J11-H2L1	11,4

2-C3-H1L1 относится к mAb с вариабельной областью тяжелой цепи 2-C3-H1 и вариабельной областью легкой цепи 2-C3-L1; для всех других гуманизированных mAb в таблице и тексте принято такое же правило наименования.

Специалисту в данной области понятно, что изменения можно вносить в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкого изобретательского замысла. Понятно, таким образом, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в пределах содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с клаудином 18.2 (CLDN18.2),

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно, или SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128 соответственно.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где CLDN18.2 представляет собой CLDN18.2 человека.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 151, 11, 152, или

вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 153, 12.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, содержащие

а) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 151, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 153;

б) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12;

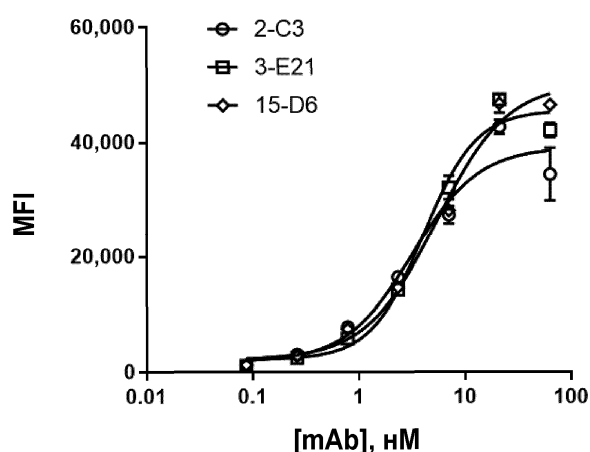
с) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 152, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 153.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или человеческим, или гуманизированным.

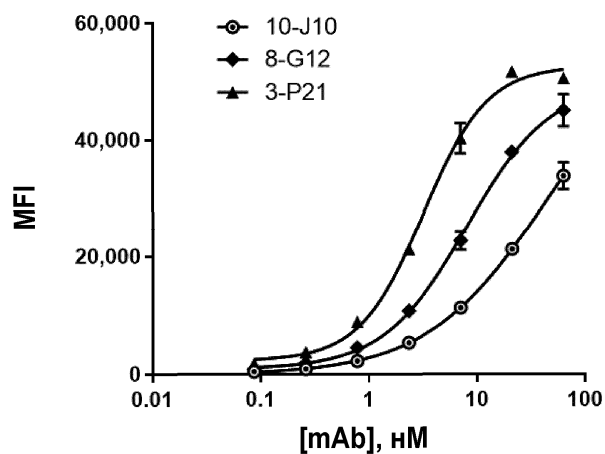
6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способен индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого фагоцитоза (ADPC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим mAb или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественной опухоли.

7. Биспецифическое антитело, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

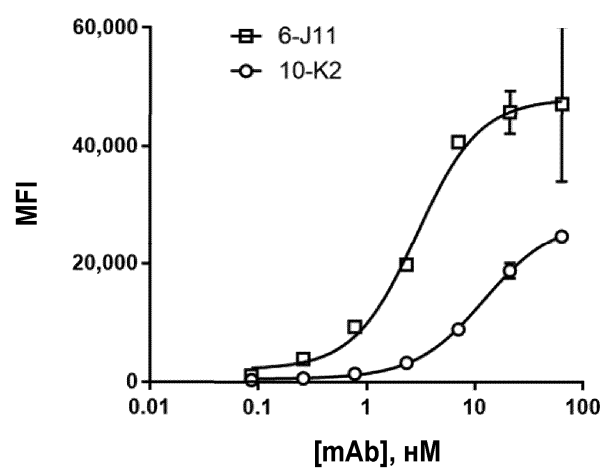
8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.
9. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по п.7.
10. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.8 или 9.
11. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.10.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 или биспецифическое антитело по п.7 и фармацевтически приемлемый носитель.
13. Способ лечения воспалительного заболевания или лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.12.
14. Способ по п.13, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчного протока, холангиокарциномы, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.
15. Способ нацеливания на CLDN18.2 на поверхности клетки злокачественной опухоли у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.12.
16. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6 или биспецифического антитела по п.7, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела из клетки или культуры.
17. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, или биспецифическое антитело по п.7, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.
18. Способ определения уровня CLDN18.2 у индивида, включающий:
 - а) получение образца у индивида;
 - б) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-6; и
 - с) определение уровня CLDN18.2 у индивида.
19. Способ по п.18, где образец представляет собой образец ткани или образец крови.
20. Способ по п.19, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.



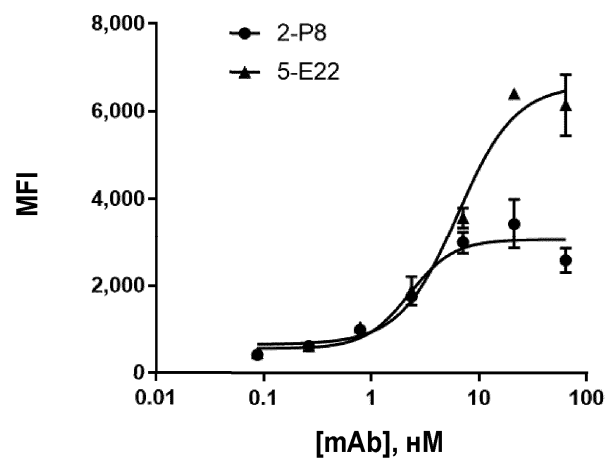
Фиг. 1А



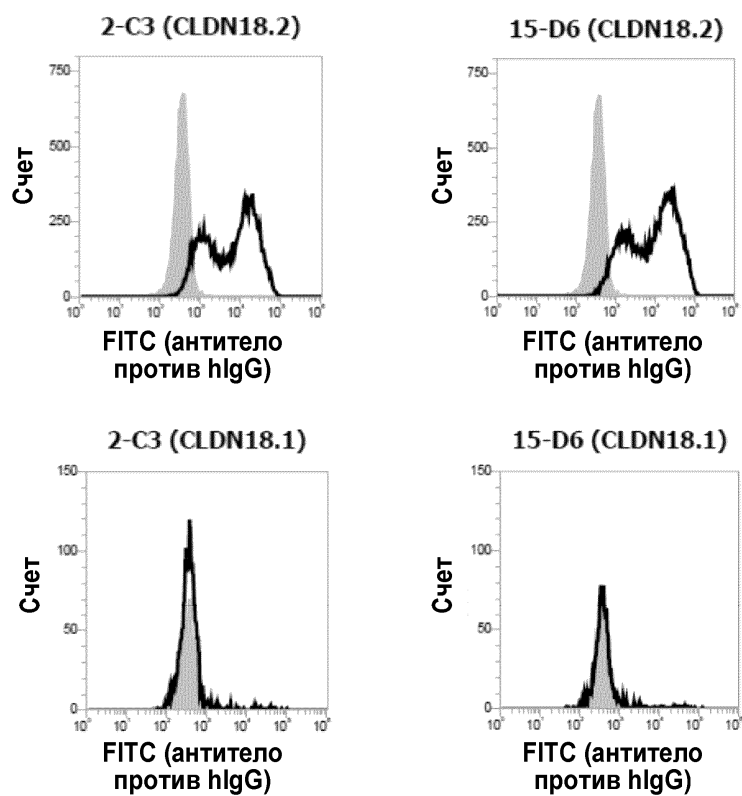
Фиг. 1B



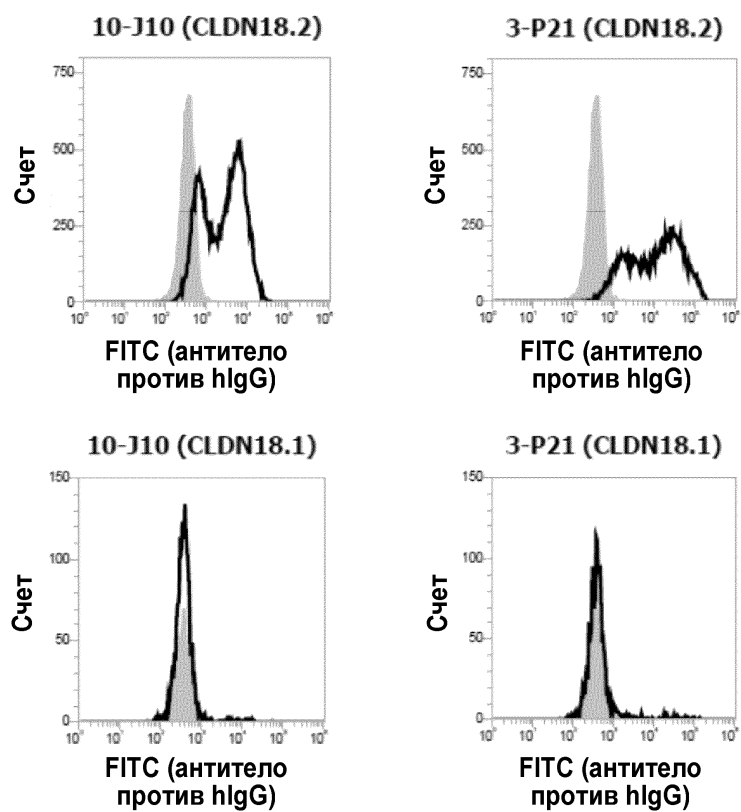
Фиг. 1C



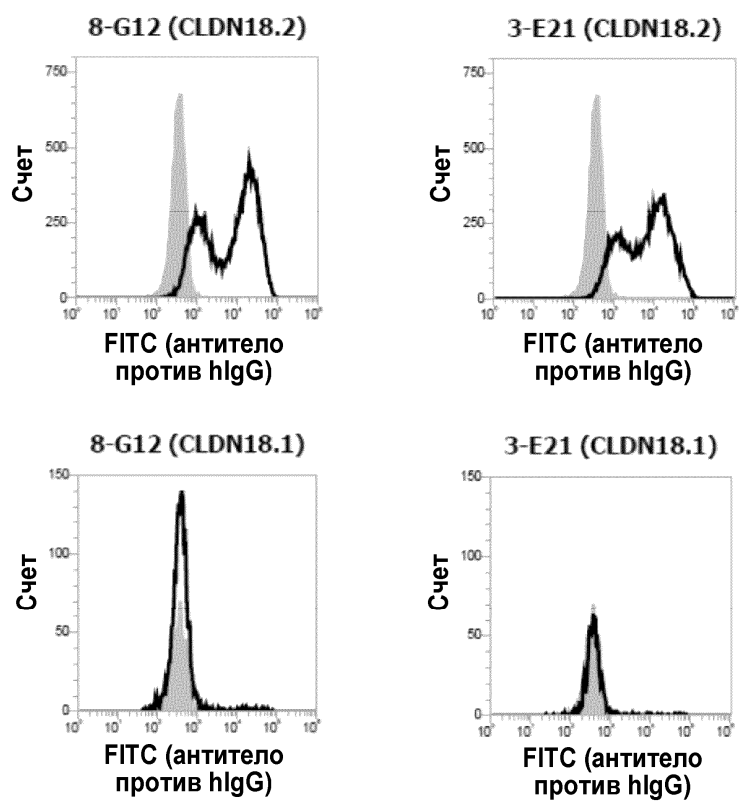
Фиг. 1D



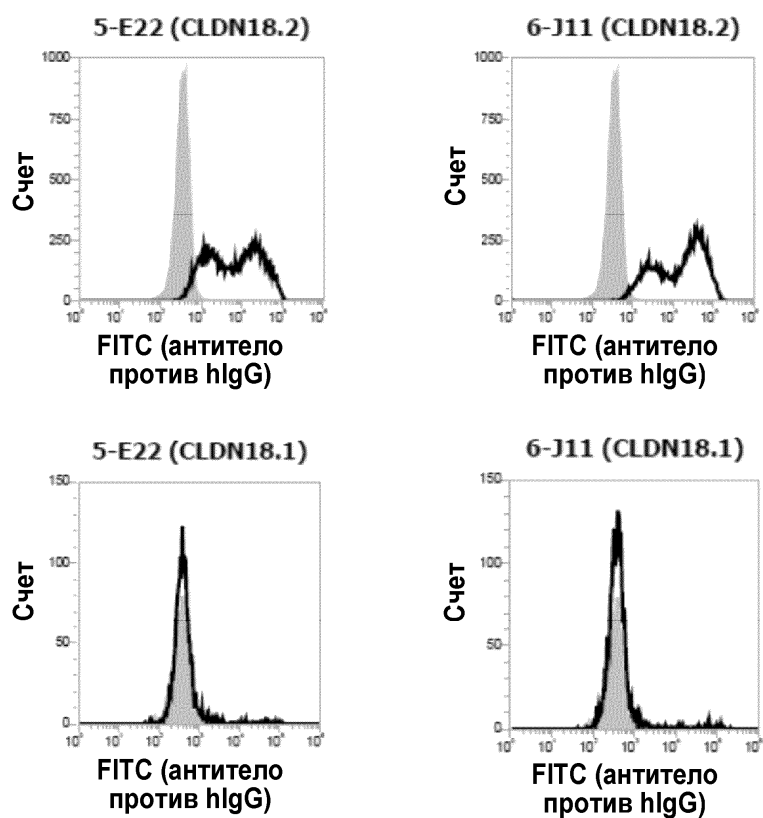
Фиг. 2А



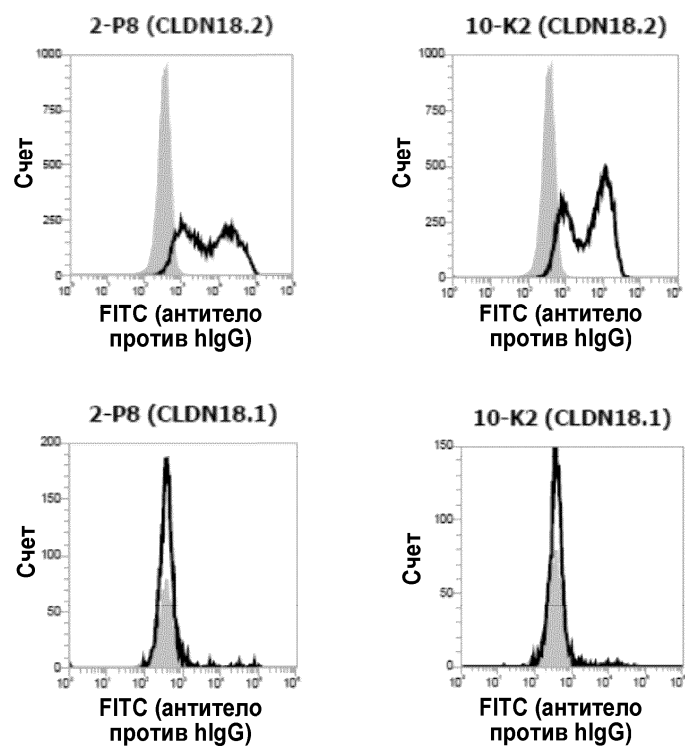
Фиг. 2В



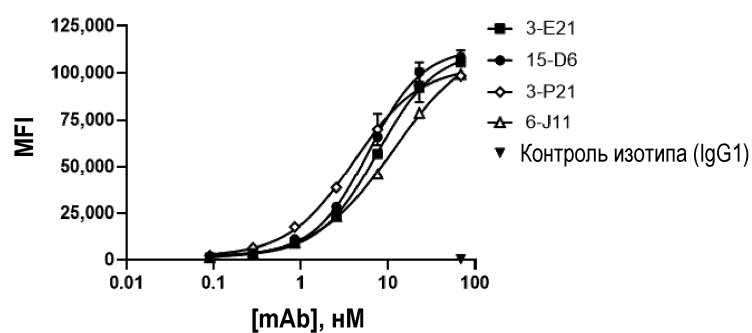
Фиг. 2С



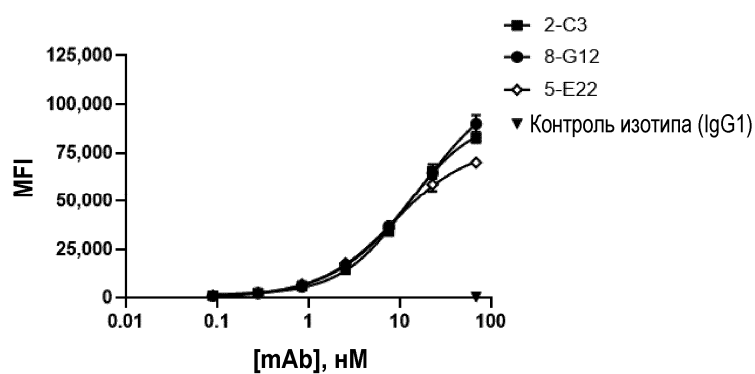
Фиг. 2D



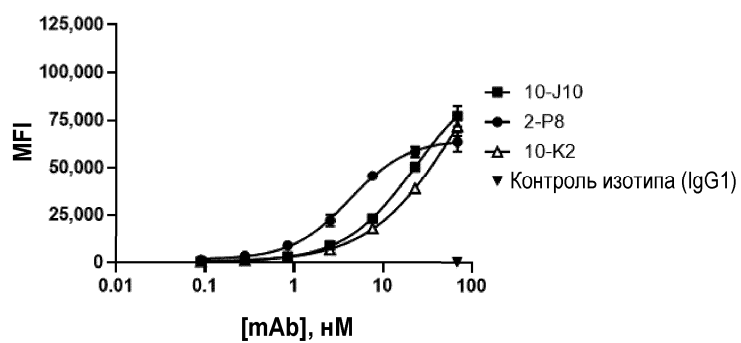
Фиг. 2Е



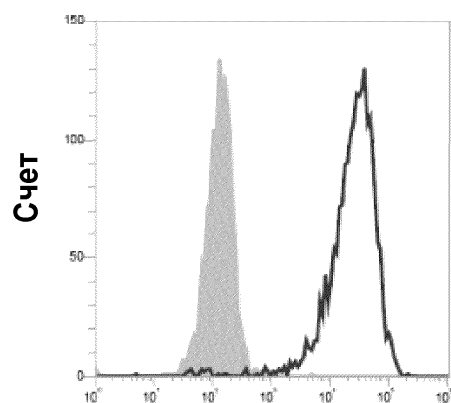
Фиг. 3А



Фиг. 3В

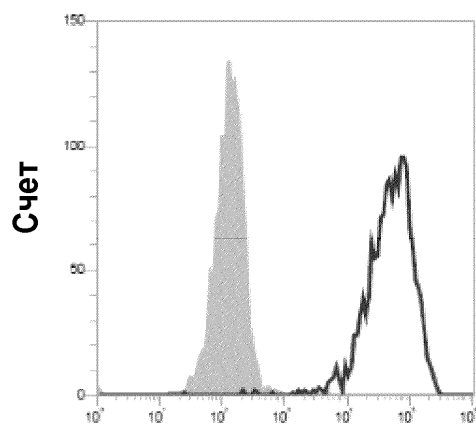


Фиг. 3С

2-C3 (CLDN18.2)

Alexa Fluor® 488
(антитело против hIgG)

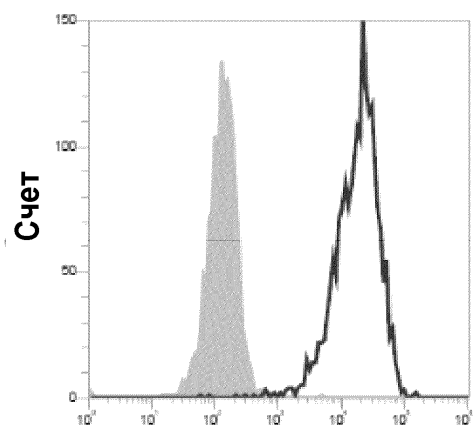
Фиг. 4А

15-D6 (CLDN18.2)

Alexa Fluor® 488
(антитело против hIgG)

Фиг. 4В

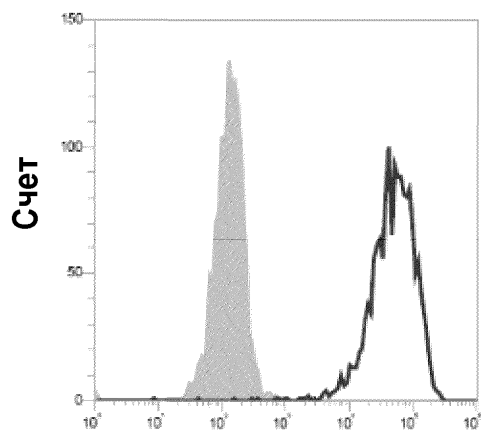
10-J10 (CLDN18.2)



Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4С

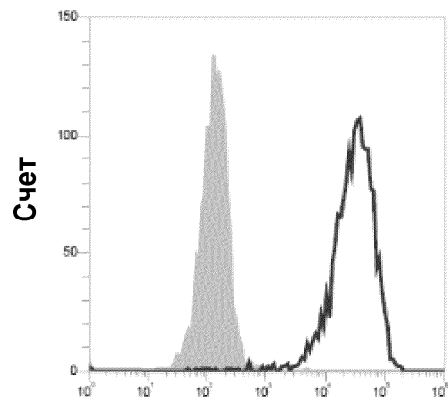
3-P21 (CLDN18.2)



Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4D

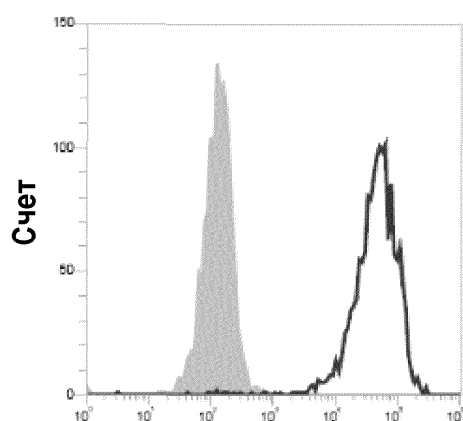
8-G12 (CLDN18.2)



Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4Е

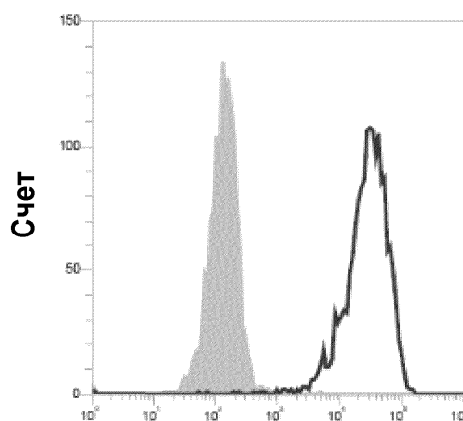
3-E21 (CLDN18.2)



Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4F

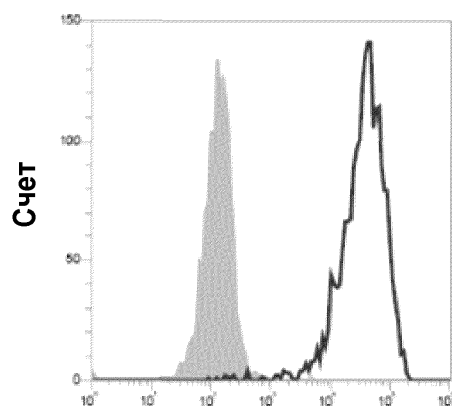
5-E22 (CLDN18.2)



Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

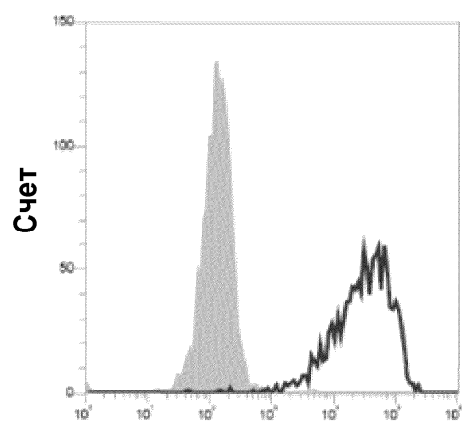
Фиг. 4G

6-J11 (CLDN18.2)



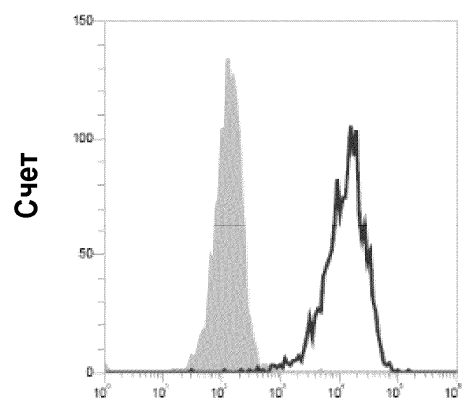
Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4H

2-P8 (CLDN18.2)

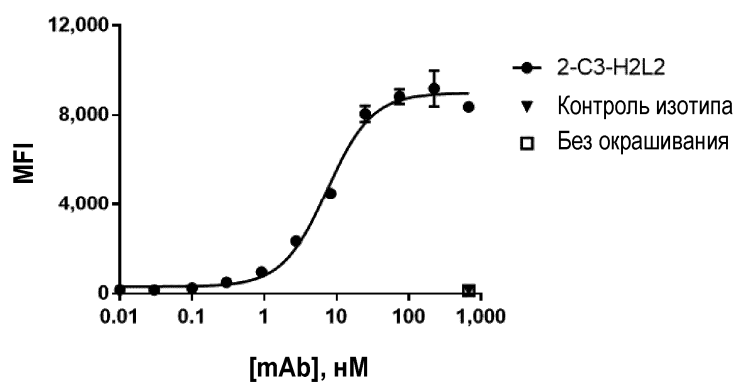
Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

Фиг. 4I

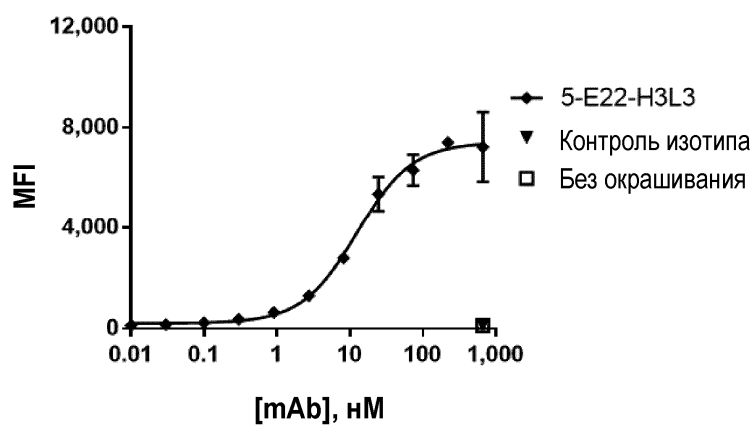
10-K2 (CLDN18.2)

Alexa Fluor® 488
(антитело против hlgG)

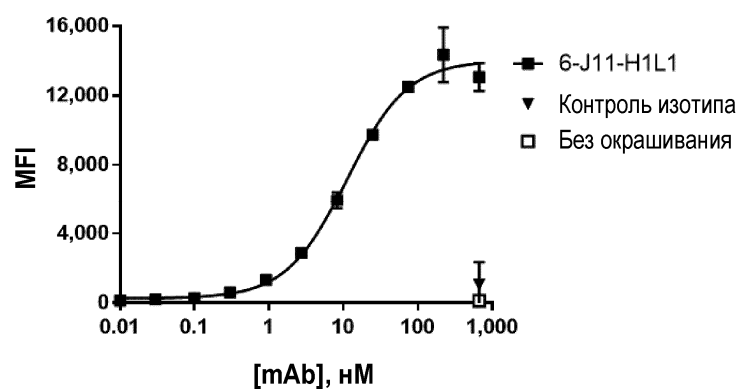
Фиг. 4J



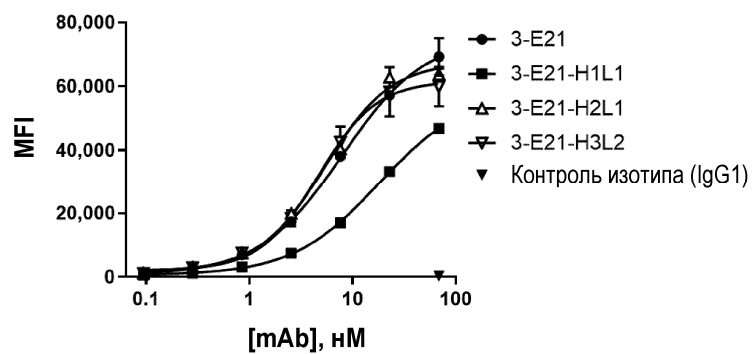
Фиг. 5A



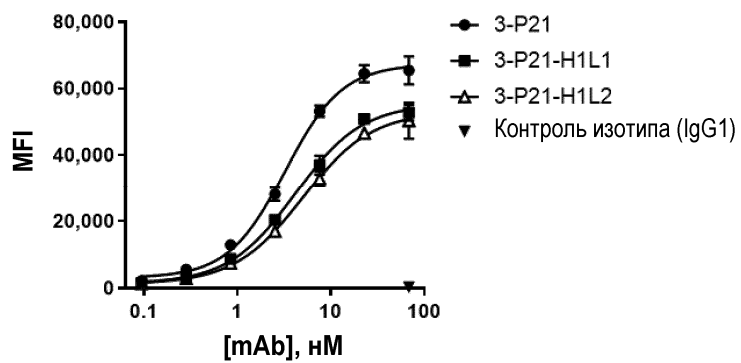
Фиг. 5B



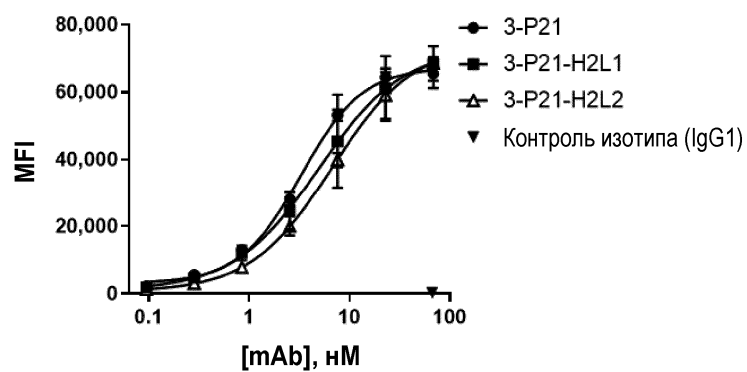
Фиг. 5C



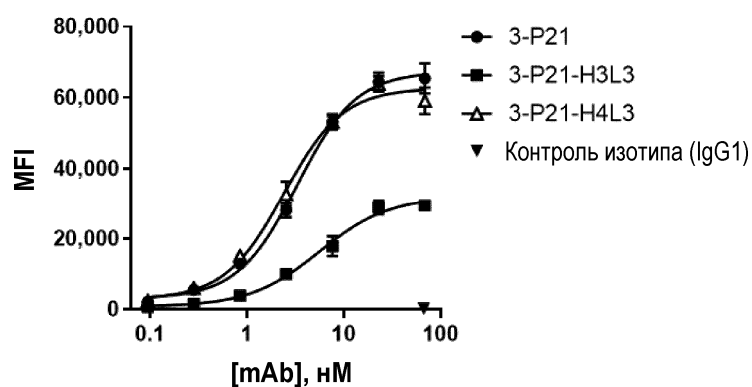
Фиг. 5D



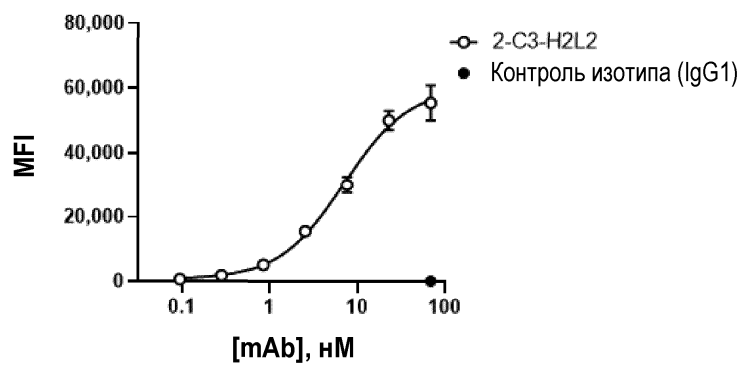
Фиг. 5E



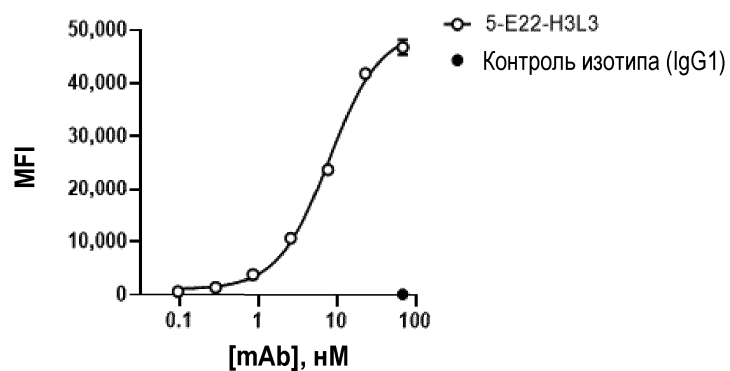
Фиг. 5F



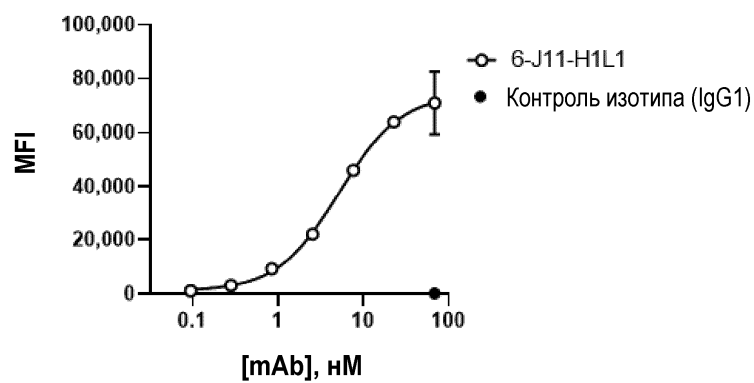
Фиг. 5G



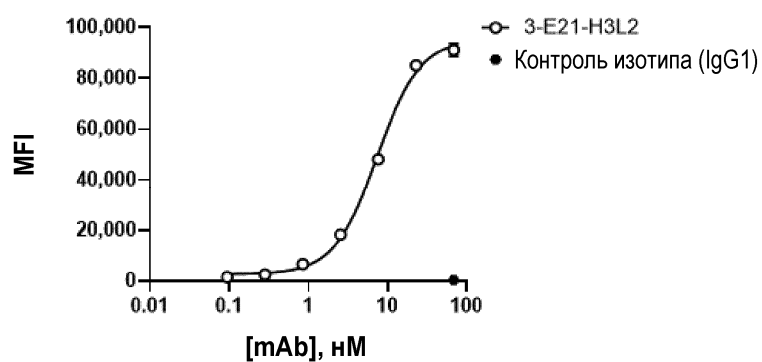
Фиг. 6A



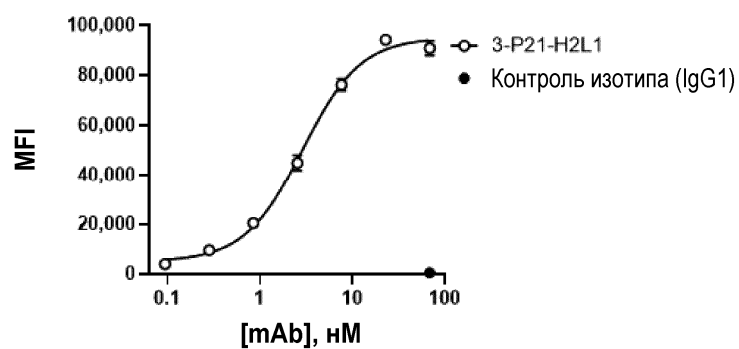
Фиг. 6B



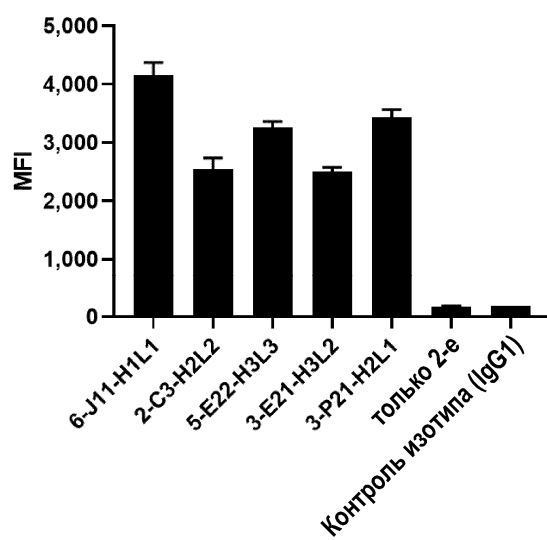
Фиг. 6С



Фиг. 6D



Фиг. 6Е



Фиг. 7

