

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190838** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.20

(22) Дата подачи заявки
2020.08.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2 И ПРОТИВ 4-1BB И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2019/100162; PCT/
CN2019/104508; PCT/CN2020/071954;
PCT/CN2020/087968

(32) 2019.08.12; 2019.09.05; 2020.01.14;
2020.04.30

(33) CN

(86) PCT/CN2020/108707

(87) WO 2021/027850 2021.02.18

(71) Заявитель:
**АЙ-МАБ БИОФАРМА ЮЭС
ЛИМИТЕД (US); АБЛ БИО ИНК.
(KR)**

(72) Изобретатель:
**Цзян Вэньцин, Фан Лэй, Ван Чжэнъи,
Гоу Бинши (CN), Парк Юнёнг, Сунг
Юнсил, Сунг Бёндзе (KR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены биспецифичные и мультиспецифичные антитела, одновременно нацеленные на клаудин 18.2 (CLDN18.2) и на 4-1BB. Эти антитела в отсутствие клеток, экспрессирующих CLDN18.2, могут связываться с 4-1BB, но неспособны активировать передачу сигналов 4-1BB. Однако в присутствии клеток, экспрессирующих CLDN18.2, эти антитела могут запускать CLDN18.2-зависимую передачу сигналов 4-1BB, что приводит к сильному иммунному ответу на опухолевые клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

202190838

A1

A1

202190838

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2 И ПРОТИВ 4-1BB И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании заявки РСТ с регистрационным номером РСТ/CN2019/100162, поданной 12 августа 2019 г., РСТ/CN2019/104508, поданной 5 сентября 2019 г., РСТ/CN2020/071954, поданной 14 января 2020 г., и РСТ/CN2020/087968, поданной 30 апреля 2020 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Клаудины – это семейство белков, которые образуют важные компоненты плотных межклеточных контактов. Сплайсированный вариант 2 клаудина 18 (CLDN18.2) представляет собой мембранный белок, специфичный для желудка. В здоровой ткани экспрессия CLDN18.2 ограничена короткоживущими дифференцированными клетками слизистой оболочки желудка в качестве компонента плотного контакта с ограниченной возможностью лечения антителами. Тем не менее, его эктопическую экспрессию на значительных уровнях наблюдали при различных первичных очагах и метастазах эпителиальных опухолевых образований, в том числе в клетках желудка, поджелудочной железы, пищевода и аденокарциномы легкого.

[0003] 4-1BB (CD137, надсемейство рецепторов фактора некроза опухоли 9) является членом надсемейства рецепторов TNF (TNFRSF) и является костимулирующей молекулой, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, как врожденного, так и адаптивного иммунитета. 4-1BB играет важную роль в модулировании активности различных иммунных клеток. Агонисты 4-1BB усиливают пролиферацию иммунных клеток, выживаемость, секрецию цитокинов CD8 Т-клетками и их цитолитическую активность. Многие другие исследования показали, что активация 4-1BB стимулирует иммунный ответ для устранения опухолей у мышей. Поэтому было высказано предположение, что 4-1BB является многообещающей молекулой-мишенью в онкоиммунологии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Предложены биспецифичные и мультиспецифичные антитела, одновременно нацеленные на клаудин 18.2 (CLDN18.2) и на 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления антитела согласно настоящей технологии включают «условную агонистическую» часть против 4-1BB, которая без связывания части против CLDN18.2 с белками CLDN18.2, экспрессируемыми на клетке, не может активировать передачу сигналов 4-1BB.

[0005] Активация передачи сигналов 4-1BB является предполагаемым механизмом действия для агонистических антител, таких как утомилумаб (PF-05082566) и урелумаб (BMS-663513). Однако части против 4-1BB в составе антител, раскрытых в настоящем документе, не требуют такой активности. В сущности, предпочтительно, чтобы части против 4-1BB настоящих антител были неспособны независимым образом активировать 4-1BB в отсутствие связывания CLDN18.2. Как продемонстрировано в примерах осуществления, обращает на себя внимание тот факт, что, когда часть против CLDN18.2 связывается с белками CLDN18.2 на клетке, такое связывание CLDN18.2 может запускать активацию передачи сигналов 4-1BB.

[0006] Предполагается, что по сравнению с известными агонистическими антителами против 4-1BB, которые обычно связаны с дозолимитирующей токсичностью, связанной с целевым действием, антитела согласно настоящему изобретению будут гораздо более безопасными. Ожидается, что в ткани, такой как печень, в которой не экспрессируется CLDN18.2, антитела согласно настоящему изобретению не будут запускать цитотоксический иммунный ответ, поскольку они не смогут активировать передачу сигналов 4-1BB. Напротив, в опухолевой ткани, в которой CLDN18.2 экспрессируется и/или доступен, антитела согласно настоящему изобретению могут инициировать мощный иммунный ответ против опухолевых клеток. Соответственно, в отличие от антител против 4-1BB, в настоящее время проходящих клинические исследования, которые обладают недостатком токсичности, связанной с целевым действием/имманентной токсичности, раскрытые в настоящем документе антитела могут быть одновременно эффективными и безопасными при лечении рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0007] На **ФИГ. 1А-С** проиллюстрировано три различных биспецифичных формата, протестированных в настоящем изобретении.

[0008] На **ФИГ. 2А-Д** представлены результаты ELISA для связывания 4-1BB и CLDN18.2.

[0009] На **ФИГ. 3** показано связывание 4-1BB в клетках.

[0010] На **ФИГ. 4А-С** показаны результаты связывания для CLDN18.2.

[0011] На **ФИГ. 5А-Д** показана CLDN18.2-зависимая активация передачи сигналов 4-1BB.

[0012] На **ФИГ. 6А-Е** показан ответ МНПК в присутствии клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

[0013] На **ФИГ. 7А-Д** показан ответ CD8⁺ Т-клеток в присутствии клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

[0014] На **ФИГ. 8А-В** показана эффективность антитела против CLDN18.2-4-1BB *in vivo* в сингенной мышинной модели и анализ *ex vivo* его воздействия на опухолевые инфильтрирующие лимфоциты.

[0015] На **ФИГ. 9А-С** показана эффективность биспецифичного антитела C-1A10 *in vivo* в сингенной мышинной модели.

[0016] На **ФИГ. 10** показана дозозависимая противоопухолевая эффективность C-1A10 и D-1A10 в сингенной мышинной модели.

[0017] На **ФИГ. 11А-Д** показана взаимосвязь фармакокинетики и фармакодинамики D-1A10 в сингенной мышинной модели.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0018] Следует отметить, что термин в единственном числе относится к одному или более выраженным таким термином объектам; например, под «антителом» подразумевается одно или более антител. Соответственно, термины в единственном числе, термины «один», «один или более» и «по меньшей мере один» в настоящем документе могут использоваться взаимозаменяемо.

[0019] В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «полипептид» охватывает «полипептид» в единственном числе, а также множество «полипептидов», и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин «полипептид» относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот, и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, «белок», «аминокислотная цепь» или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, охватываются определением «полипептид», и термин «полипептид» может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Также подразумевается, что термин «полипептид» относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитиза или модификации аминокислотами неприродного происхождения. Полипептид может происходить из естественного биологического источника или быть получен с помощью рекомбинантной технологии, однако он не обязательно транслирован с заданной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

[0020] В контексте настоящего документа термин «выделенный», используемый в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. В контексте настоящего документа термин «выделенный» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду,

которые по существу не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, если они были получены технологией рекомбинантных ДНК, или химических прекурсоров или других химических веществ, если они были получены путем химического синтеза. Кроме того, подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не встречаются в естественном состоянии. Термин «выделенный» также используется в настоящем документе для обозначения клеток или полипептидов, выделенных из других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что выделенные полипептиды включают как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

[0021] В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «рекомбинантный» при использовании в отношении полипептидов или полинуклеотидов означает форму полипептида или полинуклеотида, не существующую в природе, неограничивающий пример которой может быть создан путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, которые в обычных условиях не встречаются вместе.

[0022] «Гомология», или «идентичность», или «сходство» относится к сходству последовательностей двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которые для целей сравнения могут быть выравнены. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, молекулы в этом положении гомологичны. Степень гомологии последовательностей зависит от количества совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. «Неродственная» или «негомологичная» последовательность идентична менее чем на 40%, предпочтительно менее чем на 25%, одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

[0023] Если полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) «идентичности последовательностей» с другой последовательностью, это означает, что при выравнивании последовательностей этот процент оснований (или аминокислот) при сравнении двух последовательностей является одинаковым. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности

последовательностей могут быть определены с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно для выравнивания используются параметры по умолчанию. Одной из программ для выравнивания является BLAST, использующая параметры по умолчанию. В частности, программами являются BLASTN и BLASTP, использующие следующие параметры по умолчанию: Генетический код = стандартный; фильтр = отсутствует; цепь = обе; отсечка = 60; ожидание = 10; Матрица = BLOSUM62; Описания = 50 последовательностей; сортировать по = ВЫСОКИЙ ПРОЦЕНТ СОВПАДЕНИЯ; Базы данных = избыточные, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, имеющие указанный выше процент гомологии и кодирующие полипептид, имеющий такую же или схожую биологическую активность.

[0024] В контексте настоящего документа термин «антитело» или «антигенсвязывающий полипептид» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфичным образом распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одну его цепь. Таким образом, термин «антитело» включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лигандсвязывающую часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную (FR) область, или любую их часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

[0025] Термины «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» в контексте настоящего документа представляют собой часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv и тому подобное. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин «фрагмент антитела» включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин «фрагмент антитела» также включает любой синтетический или генетически модифицированный

белок, действующий как антитело, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса.

[0026] «Одноцепочечный вариабельный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой (V_L) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах области соединены коротким линкерным пептидом длиной от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может иметь высокое содержание глицина для гибкости, а также серина или треонина для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы scFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019.

[0027] Термин «антитело» охватывает различные широкие классы полипептидов, которые являются биохимически различимыми. Специалистам в данной области техники известно, что тяжелые цепи подразделяют на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ), среди которых также есть несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т. д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистом в данной области техники с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов со всей очевидностью находятся в пределах объема настоящего изобретения, при этом последующее обсуждение будет большей частью касаться класса IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи, как правило, соединены дисульфидными связями в конфигурацию «Y», где легкие цепи заключают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье «Y» и продолжающиеся через вариабельную область.

[0028] Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным,

поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие домен VK или VH, фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab-фрагментов, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id-антитела к антителам LIGHT, раскрытым в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0029] Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда (K , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой каппа- или лямбда-цепью. Как правило, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связываются друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда молекулы иммуноглобулинов вырабатываются гибридомами, В-клетками или генетически модифицированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенных концах Y-образной конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

[0030] Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины «константный» и «вариабельный» используются в отношении функции. В этой связи следует понимать, что вариабельные домены частей как легкой (VK), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарный перенос, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и тому подобное. Принято, что номера доменов константной области возрастают при удалении от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть является вариабельной областью, а C-концевая часть является константной областью; домены CH3 и СК фактически содержат карбоксиконец тяжелой и легкой цепей, соответственно.

[0031] Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфичным образом связывать эпитопы на антигенах. То есть, домен

VK и домен VH, или подмножество определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются, образуя переменную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из VH- и VK-цепей (т. е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в определенных молекулах иммуноглобулинов, происходящих из верблюдовых или полученных на основе иммуноглобулинов верблюдовых с помощью генной инженерии, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

[0032] В природных антителах шесть «определяющих комплементарность областей» или «CDR», присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные особым образом, образуя антигенсвязывающий домен при принятии антителом его трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые «каркасными» областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную переменность. Каркасные области в основном принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры β -листа. Таким образом, каркасные области формируют каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный занявшими свои положения CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознанным эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, могут быть легко установлены для любой отдельно взятой переменной области тяжелой или легкой цепи специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0033] В случае, когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, подразумевается, что определение термина, используемое в настоящем документе, включает все такие значения, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина «определяющая комплементарность область» («CDR») для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, присутствующих в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область была описана в источниках Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) и Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Определения CDR по Kabat и Chothia включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что использование любого из определений в контексте CDR антитела или его вариантов находится в рамках этого термина, как определено и используется в настоящем документе. Сравнение соответствующих аминокислотных остатков, включающих CDR, как определено в каждом из приведенных выше источников, приведено в таблице ниже. Точные номера остатков, включающих конкретную CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут рутинным образом определять, какие остатки образуют конкретную CDR, при известной аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0034] Kabat *et al.* также определили систему нумерации для последовательностей переменных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применить эту систему «нумерации по Kabat» к любой последовательности переменного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В контексте настоящего документа термин «система нумерации по Kabat» относится к системе нумерации, установленной Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

[0035] В дополнение к вышеприведенной таблице система нумерации по Kabat описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с 31 аминокислоты (т. е., приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после окончания CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего аминокислотного остатка после окончания CDR-H2; включает 3-25 аминокислот; и заканчивается на последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с 24 остатка (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 10-17 остатков; и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после окончания CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка после окончания CDR-L2 (т. е., после остатка цистеина); включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается на последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

[0036] Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут иметь происхождение от любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте осуществления переменная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (например, от акул).

[0037] В контексте настоящего документа термин «константная область тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи

иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из следующего: домен СН1, шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен, домен СН2, домен СН3 или его вариант или фрагмент. Например, антигенсвязывающий полипептид для использования в изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. В еще одном варианте осуществления полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, антитело для использования в изобретении может не иметь по меньшей мере части домена СН2 (например, всего или части домена СН2). Как указано выше, специалисту в данной области техники будет ясно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от природной молекулы иммуноглобулина.

[0038] Константная область тяжелой цепи антитела, раскрытого в настоящем документе, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В еще одном примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В еще одном примере участок тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

[0039] В контексте настоящего документа термин «константная область легкой цепи» включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

[0040] «Пара легкой и тяжелой цепей» относится к объединению легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом СН1 тяжелой цепи.

[0041] Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В контексте настоящего документа термин «домен VH» включает аминоконцевой переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин «домен CH1» включает первый (наиболее аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 соседствует с доменом VH и является аминоконцевым относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

[0042] В контексте настоящего документа термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, с приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела, как указано с помощью традиционных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Kabat, и остатки 231-340, система нумерации EU, см. Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 уникален тем, что не тесно связан с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо описано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

[0043] В контексте настоящего документа термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям перемещаться независимо друг от друга. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux *et al.*, *J.Immunol* 161:4083 (1998)).

[0044] Под «специфично связывает» или «обладает специфичностью к» обычно подразумевается, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена, и что связывание сопряжено с некоторой комплементарностью между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению антитело, как говорят, «специфично связывается» с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена вероятнее, чем оно связалось бы со случайным, неродственным эпитопом. Термин «специфичность» используется в настоящем документе для оценки относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом.

Например, можно считать, что антитело «А» имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело «В», или об антителе «А» можно сказать, что оно связывается с эпитопом «С» с более высокой специфичностью, чем его специфичность для родственного эпитопа «D».

[0045] В контексте настоящего документа термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где целью является предупреждение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, частичное снятие симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) течение заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное ослабление течения заболевания и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые, так и не обнаружимые. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих состояние или расстройство, а также тех, кто предрасположен к развитию этого состояния или расстройства, или тех, у кого состояние или расстройство необходимо предупредить.

[0046] Под «субъектом», «индивидуумом», «животным», «пациентом» или «млекопитающим» подразумевается любой субъект, в частности млекопитающее, для которого желательны диагностика, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, принимающих участие в спорте, или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

[0047] В контексте настоящего документа такие фразы, как «нуждающемуся в лечении пациенту» или «нуждающемуся в лечении субъекту», включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению при применении, например, для обнаружения, для процедуры диагностики и/или для лечения.

Антитела против клаудина 18.2 и против 4-1BB

[0048] 4-1BB представляет собой индуцибельный костимулирующий рецептор, экспрессируемый на активированных Т-клетках и естественных киллерах (NK). Кластеризация тримеров 4-1BB тримером лиганда 4-1BB (41BBL) на Т-клетках запускает сигнальный каскад, который приводит к повышающей регуляции антиапоптотических молекул, секреции цитокинов и усилению эффекторной функции. На NK-клетках передача сигналов 4-1BB может повышать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность. Были разработаны агонистические моноклональные антитела, нацеленные на 4-1BB, для использования передачи сигналов 4-1BB для иммунотерапии рака. Доклинические результаты на различных моделях индуцированных и спонтанных опухолей дают основания полагать, что нацеливание на 4-1BB агонистическими антителами может привести к клиренсу опухоли и устойчивому противоопухолевому иммунитету.

[0049] Два агонистических антитела, урелумаб и утомилумаб, в настоящее время проходят клинические исследования. Урелумаб обладает высокой эффективностью, но демонстрировал вызывающую воспаление токсичность для печени. Токсичность для печени, по-видимому, связана с целевым действием, поэтому ее трудно отделить от эффективности. Утомилумаб относительно безопаснее урелумаба, но при этом менее эффективен.

[0050] В представленном примере осуществления была протестирована пара антител против 4-1BB, которые были специально отобраны по их неспособности независимо активировать передачу сигналов 4-1BB. В своих моносpezifичных формах они могут связываться с 4-1BB как таковым или с 4-1BB на клеточной поверхности. Однако связывание ими 4-1BB на клеточной поверхности не приводит к активации передачи сигналов 4-1BB (см., например, **пример 3** и **ФИГ. 5**).

[0051] Обращает на себя внимание тот факт, что когда связывающие фрагменты одного из этих условных агонистических антител против 4-1BB, 1A10, были включены в биспецифичное антитело, которое дополнительно имеет часть против CLDN18.2, полученное в результате биспецифичное антитело могло эффективно активировать передачу сигналов 4-1BB зависимым от связывания CLDN18.2 образом (см. **пример 3** и **ФИГ. 5**). Стоит отметить, что в этих протестированных биспецифичных антителах

использовался Fc IgG1 с N297A для блокирования агонизма 4-1BB, опосредованного FcγR. Следовательно, активация передачи сигналов 4-1BB может быть обусловлена только связыванием CLDN18.2.

[0052] Связанная с целевым действием токсичность агонистического антитела против 4-1BB урелумаба объясняется отсутствием селективности этого антитела при агонизме 4-1BB. Однако антитела согласно настоящей технологии отличаются их способностью преодолевать данный недостаток. В ткани, такой как печень, где CLDN18.2 не экспрессируется или недоступен, антитела будут безопасными, поскольку они не могут активировать опосредованную 4-1BB цитотоксичность. Напротив, в опухолевой ткани, в которой CLDN18.2 сверхэкспрессируется или доступен, антитела осуществляют зависимую от связывания CLDN18.2 активацию передачи сигналов 4-1BB, что приводит к опосредованной 4-1BB активации иммунных клеток, тем самым обеспечивая лечение опухоли.

[0053] Таким образом, в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено антитело, которое включает единицу против клаудина 18.2 (CLDN18.2), обладающую специфичностью связывания с белком CLDN18.2, и единицу против 4-1BB, обладающую специфичностью связывания с белком 4-1BB. В предпочтительном варианте осуществления единица против 4-1BB неспособна активировать передачу сигналов 4-1BB при связывании с белком 4-1BB в отсутствие связывания единицы против CLDN18.2 с белком CLDN18.2.

[0054] Отсутствие у части против 4-1BB агонизма в отношении 4-1BB может быть достигнуто многими различными способами. Предполагается, что для активации 4-1BB требуется его кластеризация на клеточной поверхности. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления связывание единицы против 4-1BB с белками 4-1BB на клетке не приводит к кластеризации белков 4-1BB в отсутствие связывания единицы против CLDN18.2 с белком CLDN18.2.

[0055] Белок 4-1BB имеет четыре внеклеточных домена с богатыми цистеином псевдоповторами (CRD), CRD1, CRD2, CRD3 и CRD4 (см. аминокислотную последовательность и области CRD в приведенной ниже таблице). Урелумаб связывается с N-концевым CDR1 и активирует кластеризацию 4-1BB зависимым от лиганда 4-1BB (4-1BBL) образом. В некоторых вариантах осуществления единица

против 4-1BB раскрытых в настоящем документе антител не связывается с CDR1. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB раскрытых в настоящем документе антител связывается с CDR2. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB раскрытых в настоящем документе антител связывается с CDR3. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB раскрытых в настоящем документе антител связывается с CDR4.

	Последовательность и аннотация CRD (SEQ ID NO: 39)
Человеческий 4-1BB (NP_001552.2)	1 <u>MGNSCYNIVA TLLLVLNFER</u> <u>TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP</u> Сигнальный пептид CRD1
	51 <u>NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS</u> CRD2 CRD3
	101 <u>MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC</u> <u>CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG</u> CRD4
	151 <u>TKERDVVCGP</u> SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL
	201 FLLFFLTLERF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE
	251 GGCEL

[0056] В некоторых случаях кластеризация 4-1BB может опосредоваться эффекторной функцией антитела против 4-1BB. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению содержит Fc-фрагмент, который имеет уменьшенную эффекторную функцию или не имеет ее. В некоторых вариантах осуществления такие эффекторные функции представляют собой антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ).

[0057] Эффекторная функция антитела может быть изменена с использованием методов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент антитела мутирован, или изготовлен, таким образом, чтобы уменьшить или устранить его связывание с FcγR. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с FcγRI (CD64); в некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с FcγRIIA (CD32); в некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с FcγRIIB (CD32); в некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет

связывания с FcγRIIIA (CD16a); и в некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с FcγRIIIB (CD16b). В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с C1q (первый субкомпонент комплекса C1).

[0058] В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент включает одну или более мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание Fc-фрагментом FcγR или C1q. Неограничивающие примеры таких мутаций включают мутацию L235E в Fc-фрагменте IgG1, мутацию L234A и/или L235A в Fc-фрагменте IgG1, мутацию P329G или P329A в Fc-фрагменте IgG1, мутацию F234A и/или L235A или L235E в Fc-фрагменте IgG4, мутацию H268Q, V309L, A330S и/или P331S в Fc-фрагменте IgG2 и мутацию V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и/или P331S в Fc-фрагменте IgG2 (нумерация EU).

[0059] Эффекторная функция антитела также может быть уменьшена путем уменьшения или ингибирования гликозилирования Fc-фрагмента (например, агликозилированного Fc-фрагмента). Такое уменьшение или ингибирование может быть достигнуто в некоторых вариантах осуществления с помощью линии клеток, неспособной гликозилировать антитело. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент является мутированным.

[0060] Неограничивающие примеры таких мутаций включают мутацию при N297 (такую как N297A, N297G и N297Q) (нумерация EU). В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой N297A.

Форматы антител и примеры последовательностей

[0061] В примерах осуществления были протестированы три различных формата биспецифичного антитела. Среди них формат, представленный на **ФИГ. 1А**, продемонстрировал более высокую активность, чем показанные на **ФИГ. 1В** и **ФИГ. 1С**. Эти данные дают основания полагать, что в подходящем для антител согласно настоящему изобретению формате может использоваться Fab-фрагмент для части против CLDN18.2. В некоторых вариантах осуществления формат включает одноцепочечный фрагмент (scFv) для части против 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления часть против 4-1BB не расположена между Fab- и Fc-фрагментом.

[0062] В некоторых вариантах осуществления единица против CLDN18.2 включает Fab-фрагмент и предпочтительно пару Fab-фрагментов. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB включает Fab-фрагмент, предпочтительно пару Fab-фрагментов. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB включает scFv, предпочтительно пару scFv-фрагментов.

[0063] В некоторых вариантах осуществления единица против CLDN18.2 расположена со стороны N-конца единицы против 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент размещен между единицей против CLDN18.2 и единицей против 4-1BB.

[0064] Примеры последовательности CDR и последовательностей VH/VL также представлены для единицы против CLDN18.2 и единицы против 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где: CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 2; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59, или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 60, или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 4 или 60; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 61, или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 5 или 61; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 62 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 6 или 62.

Таблица А. Последовательности CDR иллюстративной единицы против 4-1BB

	Последовательность	SEQ ID NO:
--	--------------------	------------

CDRH1	SYDMS	1
CDRH2	WISYSGGSIYYADSVKG	2
CDRH3	DAQRNSMREFDY, DGQRNSMREFDY, DAQRQSMREFDY, DGQRQSMREFDY или DAQRNAMREFDY	3 56 57 58 59
CDRL1	SGSSSNIGNNYVT	4
CDRL2	ADSHRPS	5
CDRL3	ATWDYSLSGYV	6

	Последовательность	SEQ ID NO:
CDRH1	SYDMS	1
CDRH2	WISYSGGSIYYADSVKG	2
CDRH3	DAQRNSMREFDY, DGQRNSMREFDY, DAQRQSMREFDY, DGQRQSMREFDY или DAQRNAMREFDY	3 56 57 58 59
CDRL1	GYDMS	60
CDRL2	VIYPDDGNTYYADSVKG	61
CDRL3	HGGQKPTTKSSSAYGMDG	62

[0065] В некоторых вариантах осуществления CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 60; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 61; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 62.

[0066] В некоторых вариантах осуществления единица против 4-1BB содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 46-51 и 63-69, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 52-53 и 70-74.

Таблица В. Последовательности VH/VL иллюстративной единицы против 4-1BB

1A10 VH	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYS</u> <u>GGSIYYADSVKGR</u> RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREF</u> <u>DY</u> WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 24)
1A10 VL	QSVLTQPPSASGTPGQ RVTIS C <u>SGSSSNIGNNYVT</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSH</u> <u>RPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLT VL (SEQ ID NO: 25)

[0067] В некоторых вариантах осуществления единица против CLDN18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

[0068] В некоторых вариантах осуществления единица против CLDN18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где (b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[0069] В некоторых вариантах осуществления единица против CLDN18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где (c) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDRL1 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

Таблица С. Последовательности CDR примеров единиц против CLDN18.2

		Последовательность	SEQ ID NO:
4F11E2	CDRH1	TFGMH	7
	CDRH2	YITSGESPIYFTDTVKG	8
	CDRH3	SSYYGNSMDY	9
	CDRL1	RSSQSLNAGNRKNYLT	10
	CDRL2	WASTRES	11
	CDRL3	QNAYSYFPT	12
72C1B6A3	CDRH1	TYPIE	13
	CDRH2	NFHYPYNDDTKYNEKFKG	14
	CDRH3	RAYGYPYAMDY	15
	CDRL1	KSSQSLNAGNQKNYLT	16
	CDRL2	RASSRES	17
	CDRL3	QNDYIYPYT	18
120B7B2	CDRH1	GYIIQ	19
	CDRH2	FINPYNDDTKYNEQFKG	20
	CDRH3	AYFGNAFAY	21
	CDRL1	KSSQSLNAGNQKNYLT	22
	CDRL2	WASTRES	11
	CDRL3	QNAYYFPPT	23

[0070] В некоторых вариантах осуществления VH единицы против CLDN18.2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 28 и 30, а VH единицы против CLDN18.2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31.

[0071] В некоторых вариантах осуществления предложено биспецифичное антитело, имеющее формат, подобный проиллюстрированному на ФИГ. 1А. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, содержащее два первых полипептида и два вторых полипептида, где каждый первый полипептид содержит, в направлении от N- к С-концу, вариабельную область тяжелой цепи (VH), CH1, CH2, CH3 и

одноцепочечный фрагмент (scFv), обладающий специфичностью к белку 4-1BB; где каждый второй полипептид содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и CL; где каждая VH спарена с одной из VL и обладает специфичностью к белку клаудину 18.2 (CLDN18.2); и где scFv неспособен активировать передачу сигналов 4-1BB при связывании с белком 4-1BB в отсутствие связывания пар VH/VL с белком CLDN18.2.

[0072] Пара VH/VL здесь составляет единицу против CLDN18.2, а scFv составляет единицу против 4-1BB. Пара CH2-CH3/CH2-CH3 составляет Fc-фрагмент. Вышеупомянутые различные варианты осуществления, относящиеся к единице против CLDN18.2, единице против 4-1BB и Fc-фрагментам, также могут быть применимы в данном случае.

[0073] В следующей таблице представлены неограничивающие примеры первого полипептида (тяжелый компонент) и второго полипептида (легкий компонент). В некоторых вариантах осуществления каждый из первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, а каждый из вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

[0074] В некоторых вариантах осуществления каждый из первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, а каждый из вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

[0075] В некоторых вариантах осуществления каждый из первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, а каждый из вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

Таблица D. Пептидные цепи примеров биспецифичных антител

C-1A10		
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 40)	Тяжелая цепь 4F11E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSGESPIYFTDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SSYYGNSMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

			32)	
	Линкер		GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)	
	scFv 1A10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISC <u>SGSSSNIGNNYVT</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)	
		Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)	
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGR</u> FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)	
Легкий компонент (SEQ ID NO: 41)	Легкая цепь 4F11E2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RSSQSLLNAGNRKNYLT</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QONAYSYPFT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 27) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)		
D-1A10				
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 42)	Тяжелая цепь 72C1B6A3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>TYPIE</u> WVRQAPGQRLEWMG <u>NFHPYNDDTKYNEKFKGR</u> VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>RAYGYPYAMDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 28) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>A</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32)		
		Линкер		GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
	scFv 1A10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISC <u>SGSSSNIGNNYVT</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)	
		Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)	
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGR</u> FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)	
Легкий компонент (SEQ ID NO: 43)	Легкая цепь 72C1B6A3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASSRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDYIYPYT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)		

		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)
E-1A10		
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 44)	Тяжелая цепь 120B7B2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>GYIIQ</u> WVRQAPGQRLEWMG <u>FINPYNDDTKYNEQFKG</u> RVTTITRDTSASTAYMELSSLRSEDAVYYCAR <u>AYFGNAFAY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 30) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ <u>YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 32)
	Линкер	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
	scFv 1A10	VL QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSSSNIGNNYVT</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)
	Линкер	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Легкий компонент (SEQ ID NO: 45)	Легкая цепь 120B7B2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSSQSLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQP <u>PKLLIYWASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDAVYYC <u>QNAVYFPFT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

Таблица D2. Объединенные последовательности примеров биспецифичных антител

C-1A10	
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 40)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>TFGMH</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>YITSGESPIYFTD</u> <u>TVKGR</u> RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDAVYYCAR <u>SSYYGN SMDY</u> WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ <u>YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> GGGGSGGGSGGGSGGGSGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSSSNIGNN</u> <u>YVT</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYSLSGYV</u> FGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG

	FTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGRFT</u> ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS
Легкий компонент (SEQ ID NO: 41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>RSSQSLLNAGNRKNYLT</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNAISYPFT</u> FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
D-1A10	
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 42)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>TYPIE</u> WVRQAPGQRLIEWMG <u>NFHPYNDDTKYNE</u> <u>KFKGR</u> VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARR <u>RAYGYPYAMDY</u> WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>A</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSSSNIGN</u> <u>NYVT</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWD</u> <u>YSLSGYV</u> FGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGRFT</u> ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS
Легкий компонент (SEQ ID NO: 43)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>RASSRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDYIYPYT</u> FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
E-1A10	
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 44)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>GYIIQ</u> WVRQAPGQRLIEWMG <u>FINPYNDDTKYNE</u> <u>QFKGR</u> VTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>AYFGNAFAY</u> WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>A</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISC <u>SGSSSNIGNNY</u> <u>VT</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>ADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>ATWDYS</u> <u>LSGYV</u> FGCGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGRFT</u> ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS
Легкий компонент (SEQ ID NO: 45)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNAIYFPFT</u> FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0076] Специалисту в данной области техники также будет ясно, что антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть модифицированы таким образом, что их

аминокислотная последовательность будет отличаться от природного связывающего полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из обозначенного белка, может быть схожей, например, иметь определенный процент идентичности исходной последовательности, например, она может быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична исходной последовательности.

[0077] В отдельных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примеры модификаций более подробно описаны ниже. Например, антитело согласно изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функционального фрагмента (например, ПЭГ (полиэтиленгликоля), лекарственного средства, токсина или метки).

[0078] Антитела, их варианты или производные согласно изобретению включают производные, которые были модифицированы, т. е., путем ковалентного присоединения молекулы любого типа к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например, не ограничиваясь перечисленным, антитела могут быть модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными методами, включая, не ограничиваясь перечисленным, специфичное химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неканонических аминокислот.

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

[0080] Антитела могут быть конъюгированы или слиты с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки,

иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное средство или токсин, агент, усиливающий контраст ультразвукового изображения, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

[0081] Антитела могут быть мечены с возможностью обнаружения путем их связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие меченого хемилюминесцентным соединением антигенсвязывающего полипептида затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами соединений, особенно подходящих в качестве хемилюминесцентной метки, являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир оксалата.

[0082] Антитела также могут быть мечены с возможностью обнаружения с использованием металлов, испускающих флуоресцентное излучение, таких как ^{152}Eu или другие металлы семейства лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких групп, образующих комплексы с металлами, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителами хорошо известны, см. например, Arnon *et al.*, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, “Antibodies For Drug Delivery”, в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe *et al.*, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

[0083] Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитела, их варианты или производные согласно изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые переменные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части переменных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

[0084] Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления как переменные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению являются полностью человеческими. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против определенного антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на провокацию антигеном, при этом его эндогенные локусы были дезактивированы. Примеры методик, которые могут быть использованы для получения таких антител, описаны в патентах США №№ 6150584, 6458592, 6420140, полностью включенных посредством ссылки.

Способы лечения

[0085] Как описано в настоящем документе, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению могут быть использованы в определенных способах лечения и диагностики.

[0086] Настоящее изобретение дополнительно относится к методам терапии на основе антител, включающим введение антител согласно изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или

состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно изобретению (включая их варианты и производные, как описано в настоящем документе).

[0087] В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака у нуждающегося в этом пациента. Способ в одном из вариантов осуществления включает введение указанному пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента сверхэкспрессирует клаудин 18.2.

[0088] Методы клеточной терапии, такие как терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR), также охватываются настоящим изобретением. Можно использовать подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, генетически модифицированную для экспрессии антитела согласно настоящему изобретению). После такого контакта или генетической модификации клетка затем может быть введена больному раком, нуждающемуся в лечении. Больной раком может иметь рак любого типа из описанных в настоящем документе. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, опухоль-инфильтрирующий Т-лимфоцит, CD4⁺ Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку или их комбинацию, не ограничиваясь перечисленным.

[0089] В некоторых вариантах осуществления клетка была выделена от самого больного раком. В некоторых вариантах осуществления клетка была предоставлена донором или из банка клеток. Когда клетка выделена от больного раком, нежелательные иммунные реакции могут быть сведены к минимуму.

[0090] Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак головы и шеи, рак почки, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы. В

некоторых вариантах осуществления рак представляет собой один или более из рака желудка, поджелудочной железы, пищевода, яичника и легкого.

[0091] Дополнительные заболевания или состояния, связанные с повышенной выживаемостью клеток, подлежащие лечению, предупреждению, диагностике и/или прогнозированию с помощью антител или их вариантов или производных согласно изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и ассоциированные расстройства, такие как лейкоз (в том числе острые лейкозы (например, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз (в том числе миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз)) и хронические лейкозы (например, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинная полицитемия, лимфомы (например, болезнь Ходжкина и неходжкинская лимфома), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, в том числе, не ограничиваясь перечисленными, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома ободочной кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, почечноклеточный рак, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, карцинома легкого, мелкоклеточная карцинома легкого, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитома, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома, гемангиобластома, акустическая невринома, олигодендроглиома, менингиома, меланома, нейробластома и ретинобластома

[0092] Конкретная дозировка и режим лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные используемые антитела, их вариант или производное, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим

питания пациента, а также время введения, скорость выведения, комбинацию назначенных лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Оценка таких факторов медицинскими работниками находится в пределах обычной квалификации специалиста в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, подлежащего лечению, способа введения, типа рецептуры, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желаемого эффекта. Используемое количество может быть определено с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

[0093] Способы введения антител или их вариантов включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции могут быть введены любым подходящим путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальную выстилку или слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, интракостерально, интравагинально, внутрибрюшинно, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

[0094] В контексте настоящего документа термин «парентеральный» относится к способам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, интракостеральную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

[0095] Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутрижелудочковую и интратекальную инъекцию; внутрижелудочковая инъекция может быть упрощена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару, такому как резервуар Оммаи. Также может быть использовано пульмональное введение,

например, с помощью ингалятора или небулайзера и рецептуры с распыляющим агентом.

[0096] Может быть желательно вводить антигенсвязывающие полипептиды или композиции согласно изобретению местным образом в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто, например, но не ограничиваясь перечисленным, путем местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного нанесения, например, в сочетании с перевязкой раны после хирургического вмешательства, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем указанный имплантат может быть выполнен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sikalastic, или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, согласно изобретению необходимо следить, чтобы использовались материалы, не абсорбирующие белок.

[0097] Количество антител согласно изобретению, которое будет эффективным для лечения, ингибирования и предупреждения воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, расстройства или состояния, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно, в качестве вспомогательных средств для установления оптимальных диапазонов дозировок могут быть использованы *in vitro* анализы. Точная доза, которую следует использовать в препарате, также будет зависеть от способа введения и серьезности заболевания, расстройства или состояния, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и спецификой каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из систем испытаний *in vitro* или на животных моделях.

[0098] В качестве общего предложения, дозировка антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Как правило, человеческие антитела имеют более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела, происходящие из других видов, что связано с иммунным ответом на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто возможно использование более низких дозировок человеческих антител и меньшей частоты введения. Кроме того, дозировка и частота введения антител

согласно изобретению может быть уменьшена за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в мозг) с помощью модификаций, таких как, например, липидирование.

[0099] В дополнительном варианте осуществления композиции согласно изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые могут быть введены с композициями согласно изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, анти-CD40, CD40L и TNF- α .

[0100] В дополнительных вариантах осуществления композиции согласно изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, радиационная терапия.

Композиции

[0101] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям. Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

[0102] В отдельном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный федеральным или региональным надзорным органом или указанный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее как подходящий для применения у животных и, более конкретно, у человека. Кроме того, «фармацевтически приемлемый носитель» обычно представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательную композицию любого типа.

[0103] Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобные. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Физиологические растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в

частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при необходимости может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферных агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; комплексообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобного. Композиция может быть получена в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды. Пероральный препарат может включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической степени чистоты и т. д. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences за авт. E. W. Martin, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Препарат должен соответствовать способу введения. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

[0104] В одном варианте осуществления рецептура фармацевтической композиции разработана в соответствии с рутинными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения людям. Как правило, композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буферном растворе. При необходимости композиция может также включать солубилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются либо по отдельности, либо в виде смеси в составе стандартной лекарственной формы, например,

в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция подлежит введению путем инфузии, она может быть помещена, например, в инфузионную бутылку, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композиция подлежит введению путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

[0105] Соединения согласно изобретению могут быть получены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такими как соли, полученные с соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислотой и т. д., и соли, образованные с катионами, такими как соли, полученные с натрием, калием, аммонием, кальцием, гидроксидами железа (III), изопропиламином, триэтиламином, 2-этиламиноэтанолам, гистидином, прокаином и т. д.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение биспецифичных антител против CLDN18.2/4-1BB

[0106] Три ранее идентифицированных антитела против CLDN18.2, 4F11E2, 72C1B6A3 и 120B7B2, и антитело против 4-1BB, 1A10 (последовательности показаны в таблицах ниже), были отобраны для получения биспецифичных антител против CLDN18.2-4-1BB в форме полноразмерного IgG X scFv (структура, проиллюстрированная на **ФИГ. 1А**). Часть против клаудина 18.2 была размещена в части полноразмерного IgG, тогда как часть против 4-1BB представляла собой scFv, размещенный со стороны С-конца Fc-фрагмента. Полученные биспецифичные антитела включали остов IgG1 с мутацией N297A, чтобы блокировать функцию Fcγ.

Таблица 1. Последовательности антител

C-1A10		
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь 4F11E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS TFGMH WVRQAPGKGLEWVS YITSGESPIYFTDTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SSYYGNSMDY WGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 26) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

			EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY A STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32)
	Линкер		GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
	scFv 1A10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGNNYVT WYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC ATWDYSLSG YV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)
		Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
		VH	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKCLEWVS WISYSGGSIYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DAQRNSMREFDY WGQGTILTVSS (SEQ ID NO: 24)
Легкий компонент	Легкая цепь 4F11E2		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR SSQSLLNAGNRKNYLT WYQQKPGQFPKLLIY WASTRES GVDPDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYC QNAVSYPT TFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 27) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)
D-1A10			
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь 72C1B6A3		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYPIE WVRQAPGQRLEWMGNFHPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR RAYGYPYAMDY WGQGTILTVSS (SEQ ID NO: 28) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY A STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32)
	Линкер		GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
	scFv 1A10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGNNYVT WYQQLPGTAPKLLIY ADSHRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC ATWDYSLSG YV FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)
		Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)

		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Легкий компонент	Легкая цепь 72C1B6A3		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQP PKLLIY <u>RASSRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNDY</u> <u>IYPYTF</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 29) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)
E-1A10			
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь 120B7B2		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>GYIIQ</u> WVRQAPGQRLEWMG <u>FINPYND DTKYNEQFKGR</u> VTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>AYFGNAFAY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 30) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>A</u> STYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32)
		Линкер	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 34)
	scFv 1A10	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGSSSNIGNNYVT</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YADSHRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASIAISGLRSEDEADYYC <u>CATWDYSLSG</u> <u>YV</u> FGCGTKLTVL (SEQ ID NO: 25)
		Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>SYDMS</u> WVRQAPGKCLEWVS <u>WISYSGGSIYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNSMREFDY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24)
Легкий компонент	Легкая цепь 120B7B2		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u> WYQQKPGQP PKLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <u>QNAV</u> <u>YFPFT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 31) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

[0107] Последовательности 4F11E2 и 1A10 также использовали для создания биспецифичных антител двух различных форматов, как показано на ФИГ. 1B и ФИГ. 1C, соответственно. В формате, показанном на ФИГ. 1B, часть против клаудина 18.2 также имела формат Fab, в то время как часть против 4-1BB присутствовала в виде scFab-

фрагмента, вставленного между Fab против клаудина 18.2 и Fc-фрагментами. Здесь также использовали IgG1 (N297A).

Таблица 2. Антитело формата, показанного на ФИГ. 1B

Fab-scFab-Fc		
Тяжелый компонент (SEQ ID NO: 54)	Тяжелая цепь 4F11E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS TFGMH WVRQAPGKGLEWV SY ITSGESPIYFTDTVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR SSYYGNSMDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 26) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC (SEQ ID NO: 36)
	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35)
	scFab 1A10	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSC SGSSSNIGNNYVT WYQQLPGTAPKLL IY ADSHRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSL SGYV FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 53) GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS (SEQ ID NO: 37)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 38)
Легкий компонент (SEQ ID NO: 41)	Легкая цепь 1A10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGLEWV S WISYSGGSIIYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AR DAQRNSMREFDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 47) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY A STYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 32)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 38)
	Легкая цепь 4F11E2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC RSSQSLLNAGNRKNYLT WYQQKPGQ PPKLLIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSIQAEDEVAVYYC QN AYSYPFT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 27) RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 38)

[0108] В формате, показанном на ФИГ. 1C, часть против клаудина 18.2 присутствовала в полноразмерном IgG1, тогда как часть против 4-1BB представляла собой scFab-фрагмент, размещенный со стороны С-конца Fc.

Таблица 3. Антитело формата, показанного на ФИГ. 1C

IgG-scFab

[0109] Биспецифичные антитела форматов, показанных на ФИГ. 1В и 1С, уступали форматам, показанным на ФИГ. 1А, с точки зрения связывания 4-1ВВ в предварительном тестировании. Таким образом, только антитела формата, показанного на ФИГ. 1А, прошли дополнительное тестирование, как показано ниже. Кроме того, E-1A10 было немного менее активным, чем C-1A10 и D-1A10, и поэтому также не было включено в дальнейшие исследования.

Пример 2. Связывание с антигеном биспецифичных антител против CLDN18.2/4-1BB

[0110] В этом примере оценивали активности связывания биспецифичных антител из примера 1 с CLDN18.2 и 4-1BB с использованием анализов на основе белков и на основе клеток.

2.1 Связывание с 4-1BB в ELISA

[0111] Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали 100 мкл человеческого белка 4-1BB-His в концентрации 0,5 мкг/мл, разведенного в PBS (натрий-фосфатном буфере), при 4 °C на ночь, затем блокировали 100 мкл/лунку 1% BSA (бычьего сывороточного альбумина). В каждую лунку добавляли трехкратное разведение антител, начиная с 100 нМ, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с козым антителом против человеческого IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и анализировали с помощью ридера для планшетов при оптической плотности (OD) 450 нм. Как показано на **ФИГ. 2А**, антитела против CLDN18.2-4-1BB (C-1A10 и D-1A10) продемонстрировали сопоставимое связывание с моноклональными антителами против 4-1BB (1A10 и урелумабом (BMUR)).

2.2 Связывание с CLDN18.2 в ELISA

[0112] Для тестирования связывания CLDN18.2 белок CLDN18.2 экспрессировали в вирусоподобной частице (VLP), чтобы имитировать природную конформацию. Точно так же, планшеты для микротитрования покрывали 100 мкл CLDN18.2 VLP в концентрации 3 мкг/мл, разведенных в PBS, при 4 °C на ночь, затем блокировали 300 мкл/лунку 3% BSA. В каждую лунку добавляли трехкратное разведение антител, начиная с 100 нМ, и инкубировали в течение 2 часов при 37 °C. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с козым антителом против человеческого IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 30 минут при комнатной

температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали с помощью ридера для планшетов при оптической плотности 450 нм. Как показано на **ФИГ. 2В**, антитела против CLDN18.2-4-1BB (C-1A10 и D-1A10) продемонстрировали более сильное связывание, чем моноклональное антитело против CLDN18.2 (I-MAB362). В то же самое время, в тех же условиях эксперимента также тестировали связывание с белком CLDN18.1. Как показано на **ФИГ. 2С**, ни одно антитело не показало перекрестной реактивности с CLDN18.1.

2.3 Связывание с двойным антигеном в ELISA

[0113] Чтобы дополнительно продемонстрировать, что антитела против CLDN18.2-4-1BB могут связываться с CLDN18.2 и 4-1BB одновременно, был проведен тест DACE (ELISA с двойным захватом антигена). Вкратце, планшет для микротитрования покрывали 100 мкл CLDN18.2 VLP в концентрации 3 мкг/мл, разведенных в PBS, при 4 °C на ночь. Затем в каждую лунку добавляли трехкратное разведение антител, начиная с 100 нМ, и инкубировали в течение 2 часов при 37 °C. После промывки планшет затем инкубировали со 100 мкл человеческого белка 4-1BB-биотин в концентрации 1 мкг/мл в течение 1 часа при 37 °C, а затем со стрептавидином HRP в течение еще 30 минут при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали с помощью ридера для планшетов при оптической плотности 450 нм. Как показано на **ФИГ. 2D**, D-1A10 может связываться с hCLDN18.2 и 4-1BB одновременно. Напротив, mAb 72C1B6A3 против CLDN18.2 не показало сигнала в этом анализе.

2.4 Связывание с 4-1BB в клетках

[0114] Чтобы оценить свойство связывания антигена, антитела против CLDN18.2-4-1BB анализировали на их связывание с HEK293, экспрессирующими 4-1BB, с помощью FACS. В общей сложности 1×10^5 клеток HEK293-4-1BB в каждой лунке инкубировали с серийно разведенными антителами в течение 30 минут при 4 °C в буфере FACS (2% FBS в PBS). После промывки буфером FACS в каждую лунку добавляли конъюгированное с PE антитело против человеческого IgG и инкубировали при 4 °C в течение 30 минут. После промывки MFI PE оценивали с помощью FACS Caliber. Как показано на **ФИГ. 3**, протестированные антитела против CLDN18.2-4-1BB (C-1A10 и D-

1A10) показали зависимость от концентрации способности связывания с 4-1BB, сопоставимые с моноклональными антителами (1A10 и BMUR).

2.5 Связывание с CLDN18.2 в клетках

[0115] Чтобы оценить способность связывания с CLDN18.2, была получена линия клеток CHO-K1, стабильно экспрессирующая человеческий CLDN18.2. Затем линию клеток CHO-C18.2 сортировали по экспрессорам с высоким уровнем экспрессии (CHO-K1 C18.2 High) и экспрессорам с низким уровнем экспрессии (CHO-K1 C18.2 Low) с помощью проточной цитометрии. Клетки CHO-K1-C18.2 инкубировали с серийно разведенными антителами в течение 30 минут при 4 °C в буфере FACS. После промывки буфером FACS добавляли конъюгированное с PE антитело против человеческого IgG и инкубировали при 4 °C в течение 30 минут. MFI PE оценивали с помощью FACS. Как показано на **ФИГ. 4А и 4В**, антитела против CLDN18.2-4-1BB связывались с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, зависимым от концентрации образом; при этом оба биспецифичных антитела показали более сильное связывание, чем IMAB362 – референсное моноклональное антитело против CLDN18.2, которое в настоящее время проходит клинические исследования.

[0116] SNU620 представляет собой линию клеток карциномы желудка с эндогенной экспрессией CLDN18.2. Как показано на **ФИГ. 4С**, биспецифичные антитела против CLDN18.2-4-1BB могут также связываться с SNU620.

Пример 3. Функциональная активность биспецифичных антител против CLDN18.2/4-1BB

3.1 Определение функциональных характеристик биспецифичного антитела против CLDN18.2-4-1BB на линии клеток

[0117] Для проверки способности биспецифичных антител стимулировать сигнал 4-1BB, использовали коммерческий анализ с 4-1BB. В этом анализе линию клеток

GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega, № по каталогу CS196004) использовали в качестве эффекторных клеток, а в качестве клеток-мишеней использовали экспрессирующие или не экспрессирующие CLDN18.2 клетки CHO-K1 или SNU620. Линия клеток GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы по ходу транскрипции от элемента ответа. Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании антитела с рецептором 4-1BB. Вкратце, эффекторные клетки при плотности $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку смешивали с $2,5 \times 10^4$ клеток-мишеней в белом 96-луночном планшете. 6-кратно серийно разведенные антитела добавляли в белый 96-луночный аналитический планшет при конечной концентрации в диапазоне от 16,7 нМ до 0,28 фМ. После 6-часовой инкубации при 37 °С получали люминесценцию путем добавления субстрата люциферазы и измеряли с помощью ридера для микропланшетов (PHERAstar). Анализ с использованием четырехпараметрической логистической кривой был выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad.

[0118] Как показано на **ФИГ. 5**, моноклональное антитело BMUR может дозозависимо усиливать передачу сигналов 41BB, тогда как моноклональное антитело 1A10 не имело агонистической активности в тех же условиях эксперимента. Активность биспецифичных антител против CLDN18.2-4-1BB D-1A10 и C-1A10 зависела от экспрессии CLDN18.2.

3.2 Активность биспецифичных антител по стимулированию иммунного ответа мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК)

[0119] Для проверки способности биспецифичных антител к стимулированию ответа человеческих МНПК использовали анализ продукции цитокинов. В качестве эффекторных клеток использовали человеческие МНПК, стимулированные с помощью 0,5 мкг/мл человеческого антитела против CD3. CHO-K1, экспрессирующие CLDN18.2, использовали в качестве клеток-мишеней. Человеческие МНПК (1×10^5) культивировали совместно с клетками CHO-K1-CLDN18.2 или контрольными клетками CHO-K1

($2,5 \times 10^4$) в присутствии человеческого антитела против CD3. Последовательно разведенные биспецифичные антитела добавляли к смешанной культуре в конечной концентрации, начиная с 20 нМ. Через 48 часов уровень IL-2 и IFN- γ в культуральной среде измеряли с использованием набора для обнаружения IL-2 (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET Detection Kit и набора для обнаружения IFN- γ (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET Detection Kit (PerkinElmer). Как показано на **ФИГ. 6**, только биспецифичные антитела могут активировать ответ МНПК в присутствии клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

[0120] Чтобы дополнительно продемонстрировать, что активность биспецифичных антител коррелировала с уровнем CLDN18.2, человеческие МНПК от одного донора культивировали совместно с различными клетками, полученными из PDX (ксенотрансплантат от пациента) аденокарциномы желудка (GA), которые, как было доказано, экспрессируют разные уровни CLDN18.2. Последовательно разведенные биспецифичные антитела добавляли к смешанной культуре в конечной концентрации, начиная с 20 нМ. Через 48 часов уровень IL-2 в культуральной среде измеряли с использованием набора для обнаружения IL-2 (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET Detection Kit (PerkinElmer). Как показано на **ФИГ. 6D и 6E**, активность биспецифичного антитела D-1A10 коррелировала с уровнем CLDN18.2. D-1A10 эффективно активировало Т-клетки даже в опухолях с уровнем экспрессии CLDN18.2 от низкого до среднего.

3.3 Активность биспецифичных антител по стимулированию ответа человеческих CD8⁺ Т-клеток

[0121] Для дальнейшего тестирования способности биспецифичных антител активировать человеческие CD8⁺ Т-клетки, человеческие CD8⁺ Т-клетки, выделенные из МНПК, использовали в качестве эффекторных клеток. CHO-K1, экспрессирующие CLDN18.2, или SNU620, использовали в качестве клеток-мишеней. Выделенные CD8⁺ Т-клетки ($7,5 \times 10^4$) культивировали совместно с клетками-мишенями ($2,5 \times 10^4$) в присутствии человеческого антитела против CD3. Последовательно разведенные биспецифичные антитела добавляли к смешанной культуре в конечной концентрации,

начиная с 20 нМ. Уровень IL2 и IFN- γ в культуральной среде измеряли через 48 часов после совместного культивирования с использованием набора для обнаружения IL-2 (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET Detection Kit и набора для обнаружения IFN- γ (человеческого) LANCE Ultra TR-FRET Detection Kit (PerkinElmer). Как показано на **ФИГ. 7**, биспецифичные антитела C-1A10 и D-1A10 могут увеличивать продукцию как IL2, так и IFN- γ активированными CD8⁺ Т-клетками в присутствии CHO-K1, сверхэкспрессирующих C18.2 (**ФИГ. 7A-7B**), или SNU620, которые эндогенно экспрессируют C18.2 (**ФИГ. 7C-7D**).

Пример 4. Ингибирование роста опухоли биспецифичными антителами против CLDN18.2-4-1BB

[0122] Использовали гуманизированных мышей, экспрессирующих внеклеточный домен человеческого 4-1BB. Клетки аденокарциномы ободочной кишки мыши (MC38) были генетически модифицированы для экспрессии человеческого CLDN18.2. Гуманизированным мышам (h4-1BB) подкожно имплантировали клетки MC38-hCLDN18.2. Мышам внутрибрюшинно вводили раз в 3 дня, всего 5 раз, следующие антитела: изотипический контроль (10 мг/кг), антитело против CLDN18.2 (10 мг/кг), антитело против 4-1BB (10 мг/кг), комбинация против CLDN18.2 (10 мг/кг) и против 4-1BB (10 мг/кг) и биспецифичное антитело против CLDN18.2-4-1BB (13,3 мг/кг). Объемы опухолей контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю на протяжении эксперимента. Ингибирование роста опухоли, индуцированное биспецифичными антителами, было значительно больше, чем наблюдаемое с комбинацией каждого из нацеленных моноклональных антител, как показано на **ФИГ. 8**. Для дальнейшего понимания механизма действия антитела опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и периферические лимфоциты собирали и анализировали на процентное содержание CD3⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что биспецифичные антитела могут специфичным образом увеличивать количество CD3⁺

Т-клеток в микроокружении опухоли, при этом не оказывая влияния на периферическую кровь.

[0123] В другом повторном эксперименте с использованием той же животной модели была дополнительно доказана эффективность *in vivo*. На ФИГ. 9А показана кривая роста опухоли каждого животного в каждой группе. Ингибирование роста опухоли антителом против CLDN18.2-4-1BB (C-1A10) достигло 105% в конце исследования. У шести из 7 мышей в группе биспецифичного антитела не было опухолей к 25 дню после первого лечения.

[0124] Кроме того, в этом примере всех животных, получавшим антитело против CLDN18.2-4-1BB (C-1A10), повторно заражали второй дозой опухолевых клеток MC38-hCLDN18.2 в противоположный бок через 35 дней после первой инокуляции опухоли и контролировали рост опухоли без проведения дополнительного лечения. Результаты показали, что в то время как опухолевые клетки продолжали расти у наивных мышей, все мыши, получавшие BsAb, были устойчивы к повторному заражению опухолью и были признаны свободными от опухолей до конца исследования (ФИГ. 9В), что дает основания полагать, что настоящие биспецифичные антитела могут индуцировать долгосрочную защитную иммунологическую память против опухолей MC38. Точно так же в сателлитной группе (N=3/группа), где мыши получали такое же лечение, опухоли извлекали через 3 дня после второй дозы антител для количественного определения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL). Процент CD45⁺ и CD8⁺ TIL был значительно выше в группе, получавшей лечение BsAb. Напротив, воздействие на периферические лимфоциты отсутствовало (ФИГ. 9С).

[0125] Чтобы дополнительно оценить противоопухолевую эффективность биспецифичных антител против CLDN18.2-4-1BB, гуманизированным мышам 4-1BB с имплантированными антителами MC38-hCLDN18.2 вводили различные концентрации биспецифичных антител. Мышам внутрибрюшинно вводили раз в 3 дня, всего 4 раза, следующие антитела: изотипический контроль (10 мг/кг), C-1A10 (13,3 мг/кг), C-1A10 (2,6 мг/кг), C-1A10 (0,5 мг/кг), D-1A10 (13,3 мг/кг), D-1A10 (2,6 мг/кг), D-1A10 (0,5 мг/кг). Объемы опухолей контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю на протяжении эксперимента. Как показано на ФИГ. 10, как C-1A10, так и D-1A10 могут подавлять рост опухоли дозозависимым образом.

[0126] Чтобы понять взаимосвязь фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики антитела против CLDN18.2-4-1BB в случае гуманизированных мышей, гуманизированным мышам с опухолями осуществляли однократное введение D-1A10 в 3 различных концентрациях. Концентрацию в сыворотке измеряли в различные моменты времени. Как показано на **ФИГ. 11**, в целом она демонстрировала дозозависимый ФК-профиль. И эффективность *in vivo* коррелировала с уровнем дозы. Анализ ТП *ex vivo* показал дозозависимое увеличение количества CD8⁺ клеток и CD45⁺ клеток.

Пример 5. Тестирование дополнительных условных агонистических полностью человеческих антител против 4-1BB

[0127] Следующие антитела против 4-1BB были отобраны по их способности связываться с 4-1BB с высокой аффинностью и не активировать передачу сигналов 4-1BB при связывании.

Таблица 4. Дополнительные антитела против 4-1BB

Антитело №	VH	SEQ ID NO:
41B01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNS</u> MREFDYWGQGTLVTVSS	46
41B01.01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNS</u> MREFDYWGQGTLVTVSS	47
41B01.02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRQS</u> MREFDYWGQGTLVTVSS	48
41B01.03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRQS</u> MREFDYWGQGTLVTVSS	49
41B01.04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>DAQRNA</u> MREFDYWGQGTLVTVSS	50
41B02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKGLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKP TTKSSSAYGMDGWQGTLVTVSS	51

Антитело №	VL	SEQ ID NO:
41B01	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	52
41B01.01	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	52

41B01.02	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	52
41B01.03	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	53
41B01.04	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	53
41B02	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGGG TKLTVL	52

CDR для VH в таблице 4

SEQ ID NO	VH_CDR1	SEQ ID NO	VH_CDR2	SEQ ID NO	VH_CDR3
1	SYDMS	2	WISYSGGSIYYADSVKG	3	DAQRNSMREFDY
				56	DGQRNSMREFDY
				57	DAQRQSMREFDY
				58	DGQRQSMREFDY
				59	DAQRNAMREFDY
60	GYDMS	61	VIYPDDGNTYYADSVKG	62	HGGQKPTTKSSSAYGMDG

Таблица 5. VH и VL scFv против 4-1BB

Антитело №	VH	SEQ ID NO:
41B01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGTLLTVSS	63
41B01.01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGTLLTVSS	64
41B01.03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGTLLTVSS	65
41B01.04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNS MREFDYWGQGTLLTVSS	66
41B02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAYYYCAKHGGQKP TTKSSSAYGMDGWGQGTLLTVSS	67
41B02.01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIY PDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGGQKP TTKSSSAYGMDGWGQGTLLTVSS	68

Антитело №	VL	SEQ ID NO:
41B01	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	69
41B01.01	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	70

	TKLTVL	
41B01.03	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	71
41B01.04	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	72
41B02	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	73
41B02.01	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYAD SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCG TKLTVL	74

5.1 Связывание антигена, измеренное с помощью ELISA

[0128] Для оценки антигенсвязывающей активности антитела подвергали тесту ELISA. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывали человеческим белком 4-1BB-Fc в концентрации 0,1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунку при 4 °C на ночь, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% BSA. В каждую лунку добавляли пятикратные разведения антител, начиная с 10 мкг/мл, и инкубировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с козьим антителом против человеческого IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали с помощью спектрофотометра при оптической плотности 450-630 нм. Протестированные антитела против 4-1BB продемонстрировали способность связываться с 4-1BB.

5.2 Связывание клеток, измеренное с помощью FACS

[0129] Чтобы оценить свойство связывания антигена, антитела-кандидаты анализировали на их связывание с экспрессируемым у млекопитающих 4-1BB с помощью FACS. Вкратце, клетки 4-1BB-Jurkat инкубировали с антителами. После промывки буфером FACS (1%BSA в PBS) в каждую лунку добавляли конъюгированное с FITC антитело против человеческого IgG и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. MFI FITC оценивали с помощью FACS Caliber. Протестированные антитела против 4-

1BV продемонстрировали способность связываться с 4-1BV, экспрессируемым на клеточной поверхности, и способны эффективно связываться с 4-1BV, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

5.3 Кинетика белков для 4-1BV

[0130] Чтобы изучить кинетику связывания антител, в этом примере было выполнено ранжирование аффинности с использованием Octet Red 96. Как показано в таблице 5, протестированные антитела против 4-1BV имели высокие аффинности связывания 4-1BV.

Таблица 5. Кинетика связывания

Антитело	KD (M)	kon(1/Mc)	kdis(1/c)	Chi	R ²
41B01	1,80E-10	6,58E+05	1,19E-04	0,0392	0,9987
41B02	1,01E-09	5,95E+05	6,03E-04	0,0525	0,9973

* * *

[0131] Объем настоящего изобретения не должен быть ограничен отдельными описанными вариантами осуществления, которые играют роль отдельных иллюстраций конкретных аспектов изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть подвергнуты различным модификациям и вариациям без отклонения от сущности или объема изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение охватывает его модификации и вариации при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

[0132] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретным и индивидуальным образом включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее:
единицу против клаудина 18.2 (CLDN18.2), обладающую специфичностью связывания с белком CLDN18.2; и
единицу против 4-1BB, обладающую специфичностью связывания с белком 4-1BB,
где указанная единица против 4-1BB неспособна активировать передачу сигналов 4-1BB при связывании с белком 4-1BB в отсутствие связывания единицы против CLDN18.2 с белком CLDN18.2.
2. Антитело по п. 1, где связывание единицы против 4-1BB с белками 4-1BB на клетке не приводит к кластеризации белков 4-1BB в отсутствие связывания единицы против CLDN18.2 с белком CLDN18.2.
3. Антитело по п. 1 или п. 2, дополнительно содержащее Fc-фрагмент, который имеет уменьшенную эффекторную функцию.
4. Антитело по п. 3, где эффекторная функция представляет собой антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ).
5. Антитело по п. 4, где Fc-фрагмент имеет уменьшенное связывание или не имеет связывания с FcγR или C1q.
6. Антитело по п. 5, где Fc-фрагмент имеет одну или более мутаций, чтобы уменьшить или устранить связывание FcγR или C1q.

7. Антитело по п. 6, где Fc-фрагмент выбран из группы, состоящей из:
Fc-фрагмента IgG1 с мутацией L235E,
Fc-фрагмента IgG1 с мутацией L234A и/или L235A,
Fc-фрагмента IgG1 с мутацией P329G или P329A,
Fc-фрагмента IgG4 с мутацией F234A и/или L235A или L235E,
Fc-фрагмента IgG2 с мутацией H268Q, V309L, A330S и/или P331S, и
Fc-фрагмента IgG2 с мутацией V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S
и/или P331S (нумерация EU).
8. Антитело по п. 3, где Fc-фрагмент является агликозилированным.
9. Антитело по п. 8, где Fc-фрагмент содержит мутацию, устраняющую гликозилирование.
10. Антитело по п. 9, где присутствует мутация имеет в N297, необязательно N297A, N297G или N297Q.
11. Антитело по п. 3, где Fc-фрагмент содержит мутацию N297A или комбинацию мутаций L234A и L235A.
12. Антитело по любому из пп. 1-11, где единица против CLDN18.2 содержит Fab-фрагмент.
13. Антитело по п. 12, где единица против CLDN18.2 содержит пару Fab-фрагментов.
14. Антитело по любому из пп. 1-13, где единица против 4-1BB содержит Fab-фрагмент или одноцепочечный фрагмент (scFv).

15. Антитело по п. 14, где единица против 4-1BB содержит пару scFv.
16. Антитело по п. 14 или п. 15, где ScFv находится со стороны С-конца Fc-фрагмента в составе единицы против CLDN18.2.
17. Антитело по любому из пп. 1-16, где единица против 4-1BB содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:
 - CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1;
 - CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, с которой имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 2;
 - CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59;
 - CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 60 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 4 или 60;
 - CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 61 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 5 или 61; и
 - CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 62 или аминокислотную последовательность, которая имеет одну или две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 6 или 62.

18. Антитело по любому из пп. 1-16, где единица против 4-1BB содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 60;

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 61; и

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 62.

19. Антитело по любому из пп. 1-18, где единица против 4-1BB содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 46-51 и 63-68, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 52-53 и 69-74.

20. Антитело по любому из пп. 1-19, где единица против CLDN18.2 содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

(a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

(b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,

- CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
 CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
 CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
 CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
 CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или
- (с) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;
 CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
 CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;
 CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
 CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и
 CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.
21. Антитело по п. 20, где VH единицы против CLDN18.2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 28 и 30, а VL единицы против CLDN18.2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31.
22. Антитело, содержащее два первых полипептида и два вторых полипептида, где каждый из указанных первых полипептидов содержит, в направлении от N- к С-концу, переменную область тяжелой цепи (VH), CH1, CH2, CH3 и одноцепочечный фрагмент (scFv), обладающий специфичностью к белку 4-1BB;
- где каждый из указанных вторых полипептидов содержит переменную область легкой цепи (VL) и CL;
- при этом каждая VH спарена с одной из VL и обладает специфичностью к белку клаудину 18.2 (CLDN18.2); и

при этом scFv неспособен активировать передачу сигналов 4-1BB при связывании с белком 4-1BB в отсутствие связывания пар VH/VL с белком CLDN18.2.

23. Антитело по п. 22, где CH2 и CH3 составляют Fc-фрагмент, который имеет уменьшенную эффекторную функцию.

24. Антитело по п. 23, где Fc-фрагмент выбран из группы, состоящей из:
 Fc-фрагмента IgG1 с мутацией L235E,
 Fc-фрагмента IgG1 с мутацией L234A и/или L235A,
 Fc-фрагмента IgG1 с мутацией P329G или P329A,
 Fc-фрагмента IgG4 с мутацией F234A и/или L235A или L235E,
 Fc-фрагмента IgG2 с мутацией H268Q, V309L, A330S и/или P331S, и
 Fc-фрагмента IgG2 с мутацией V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и/или P331S (нумерация EU).

25. Антитело по п. 23, где Fc-фрагмент содержит мутацию в N297, необязательно N297A, N297G или N297Q.

26. Антитело по любому из пп. 22-25, где scFv содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 56, 57, 58 или 59;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 60;

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 61; и

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 62.

27. Антитело по любому из пп. 22-26, где scFv содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 46-51 и 63-68, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 52-53 и 69-74.

28. Антитело по любому из пп. 22-27, где VH в составе пары VH/VL содержит CDRH1, CDRH2 и CDRH3, а VL в составе пары VH/VL содержит CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где:

- (a) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и
CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
- (b) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16;
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, или
- (c) CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;
CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;
CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;
CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; и

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

29. Антитело по п. 27, где VH в составе пары VH/VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 28 и 30, а VL в составе пары VH/VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29 и 31.

30. Антитело по п. 22, где каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, а каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

31. Антитело по п. 22, где каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, а каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

32. Антитело по п. 22, где каждый из указанных первых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, а каждый из указанных вторых полипептидов содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

33. Один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело по любому из пп. 1-32.

34. Композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

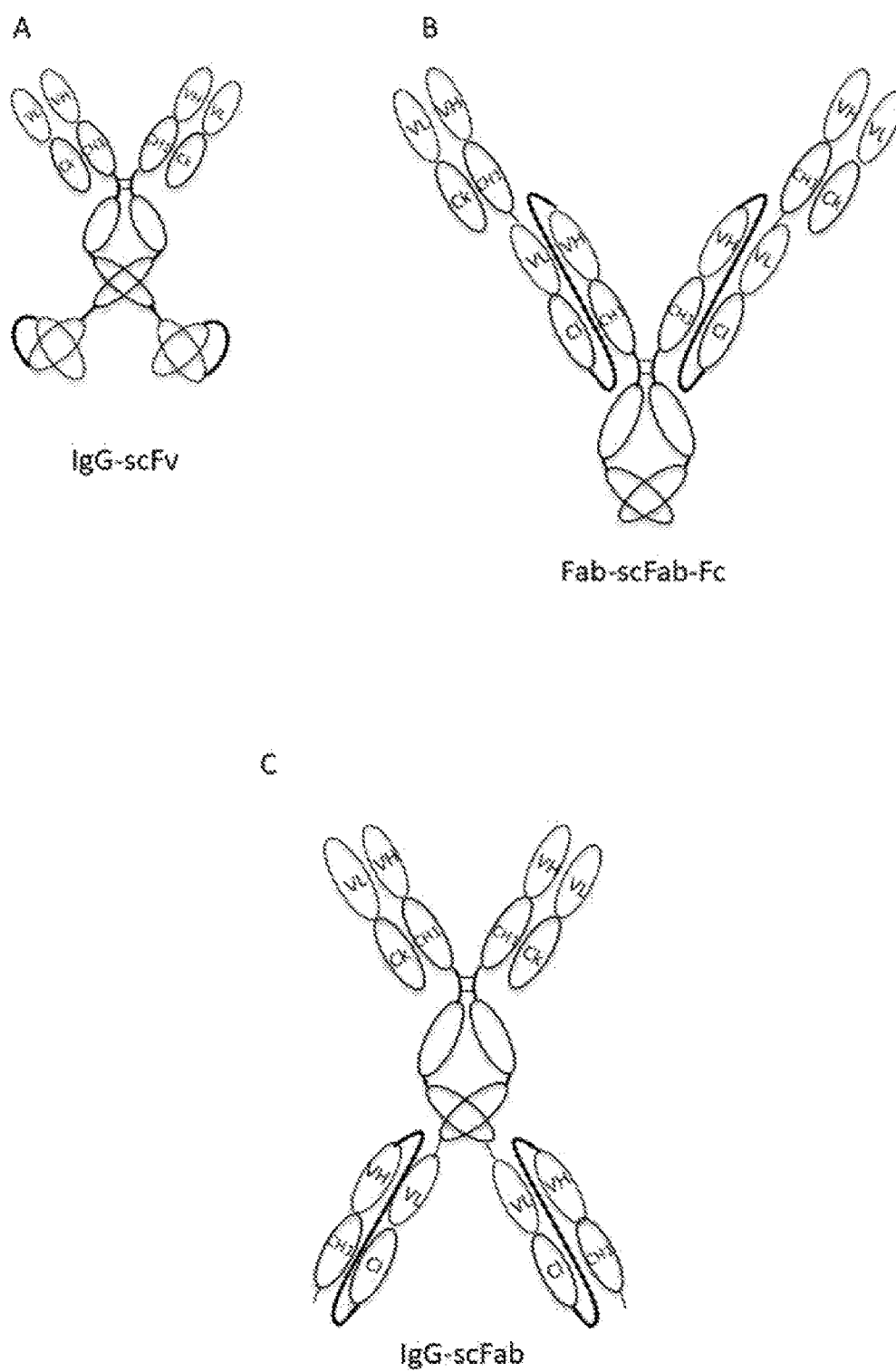
35. Применение антитела по любому из пп. 1-32 для получения лекарственного средства для лечения рака.

36. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение указанному пациенту антитела по любому из пп. 1-32.

37. Применение по п. 35 или способ по п. 36, где рак характеризуется раковой клеткой, которая сверхэкспрессирует CLDN18.2 по сравнению с соответствующей нормальной клеткой.

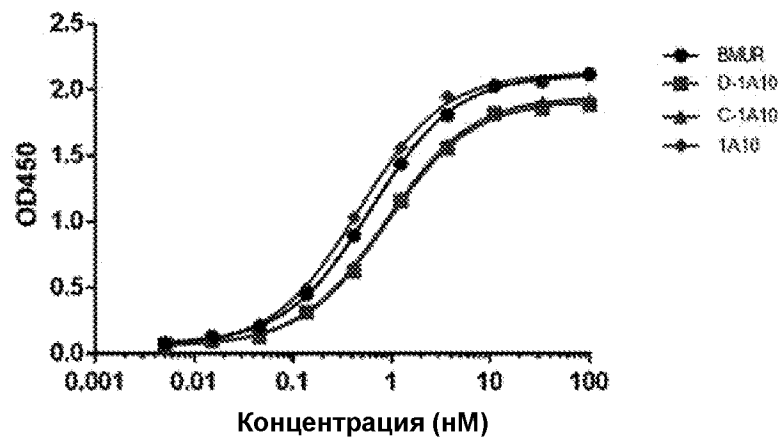
38. Применение по п. 35 или п. 37 или способ по п. 36 или п. 37, где рак представляет собой эпителиальную опухоль, или где рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака головы и шеи, рака почки, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

39. Применение по п. 35 или п. 37 или способ по п. 36 или п. 37, где рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легкого и рака яичника.

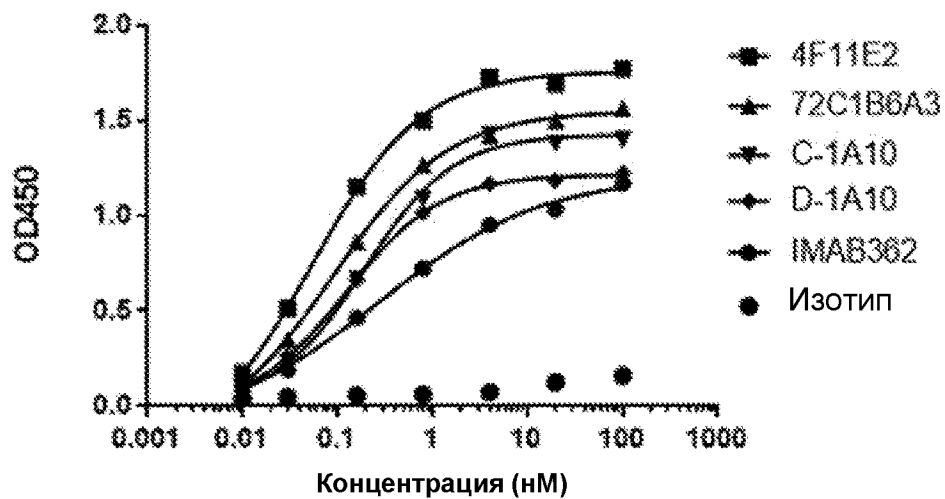


ФИГ. 1

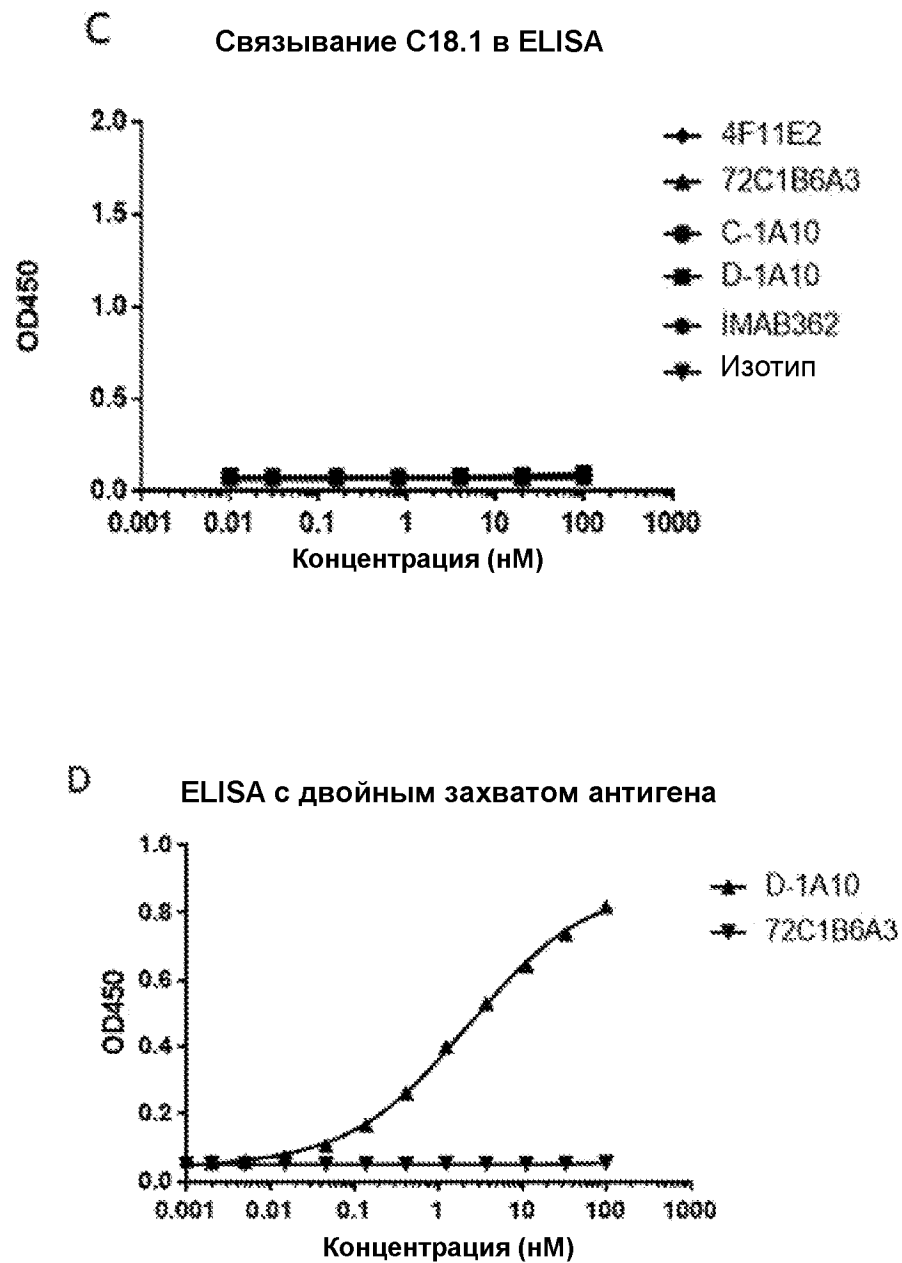
А Связывание 4-1BB в ELISA



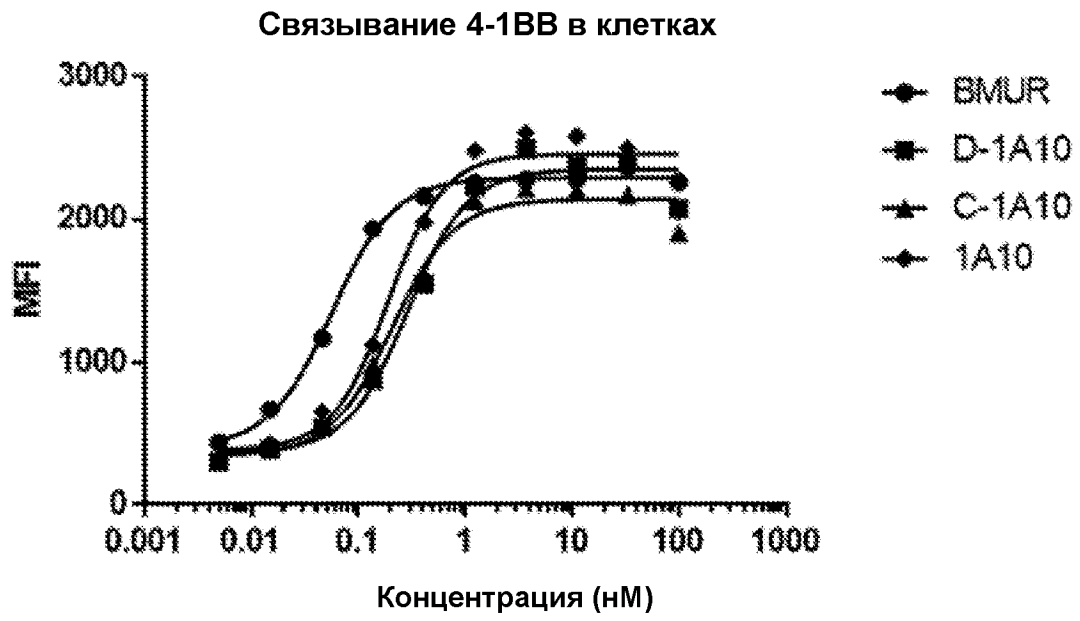
В Связывание C18.2 в ELISA



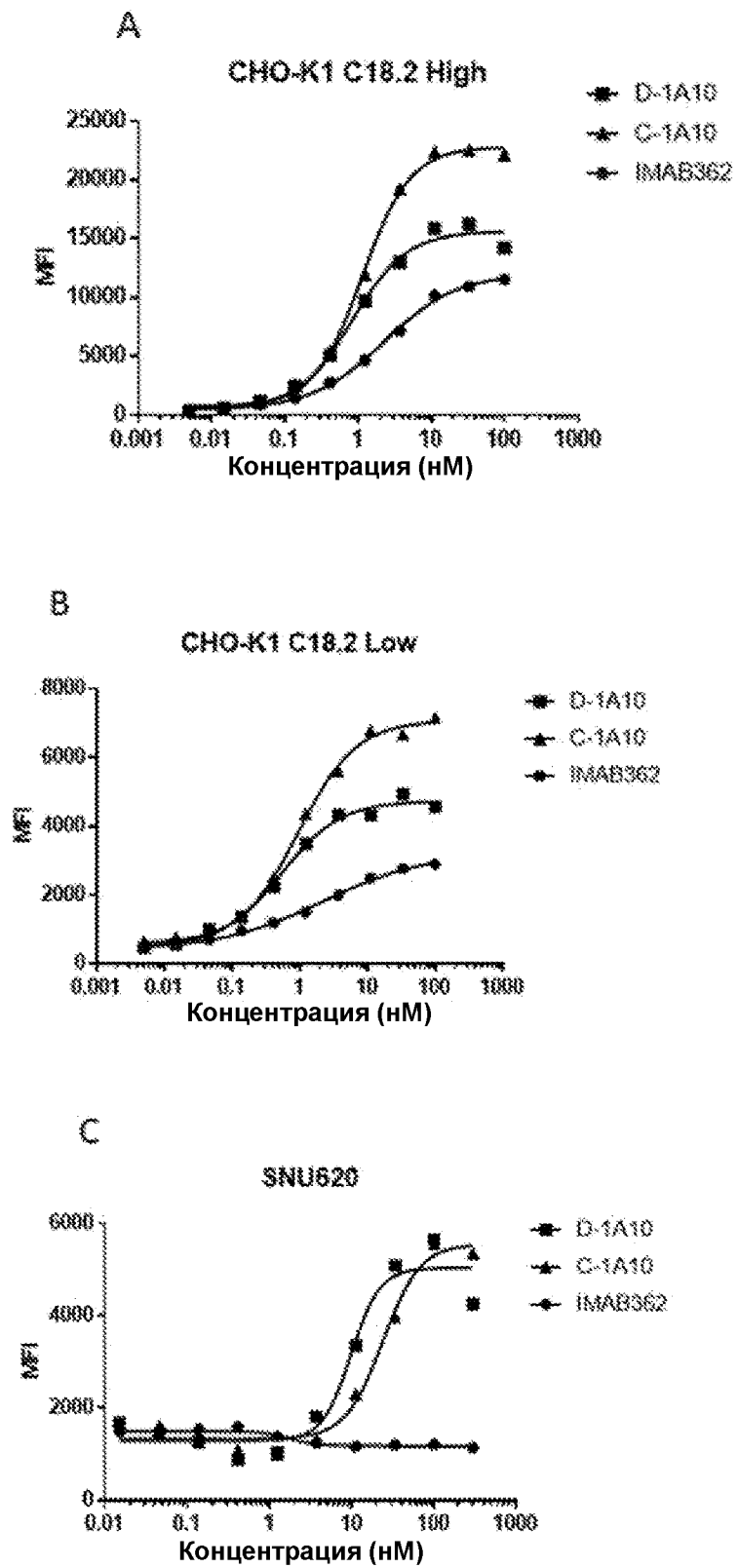
(продолжение)



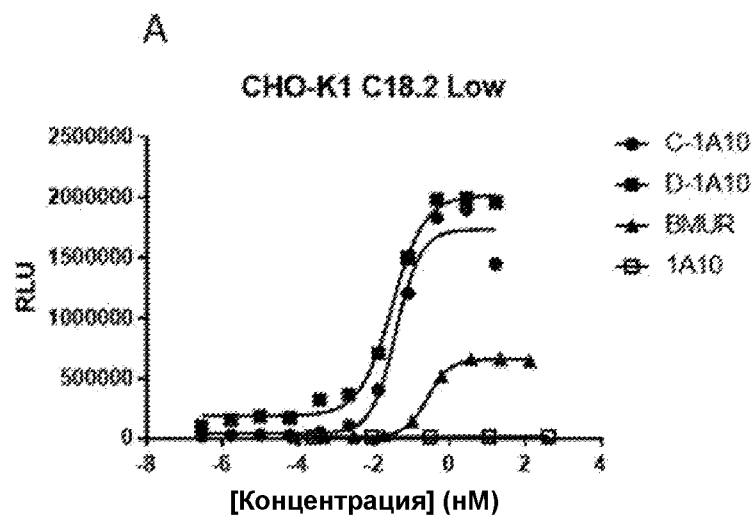
ФИГ. 2



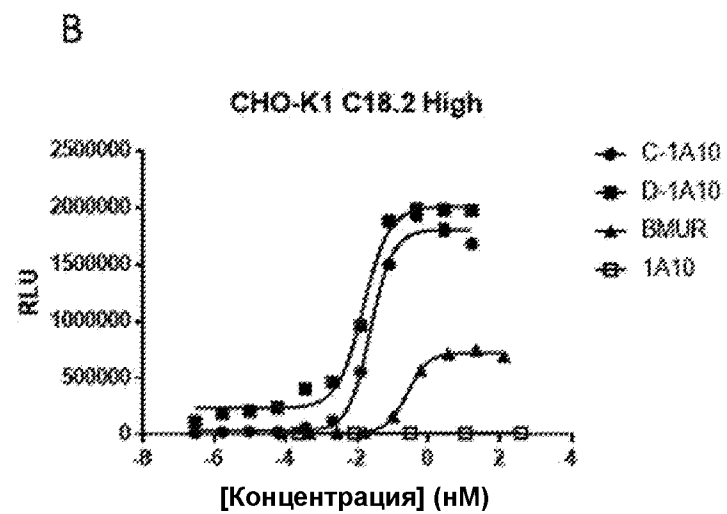
ФИГ. 3



ФИГ. 4

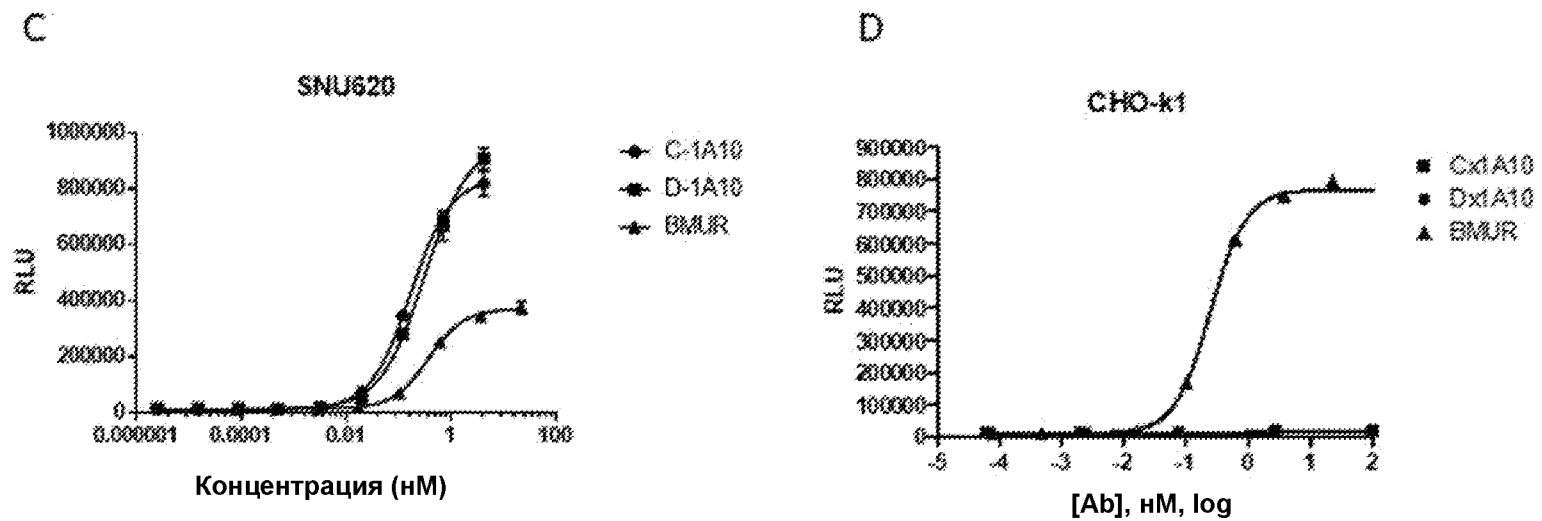


	EC50 (нМ)
C-1A10	0,038
D-1A10	0,030
BMUR	0,26



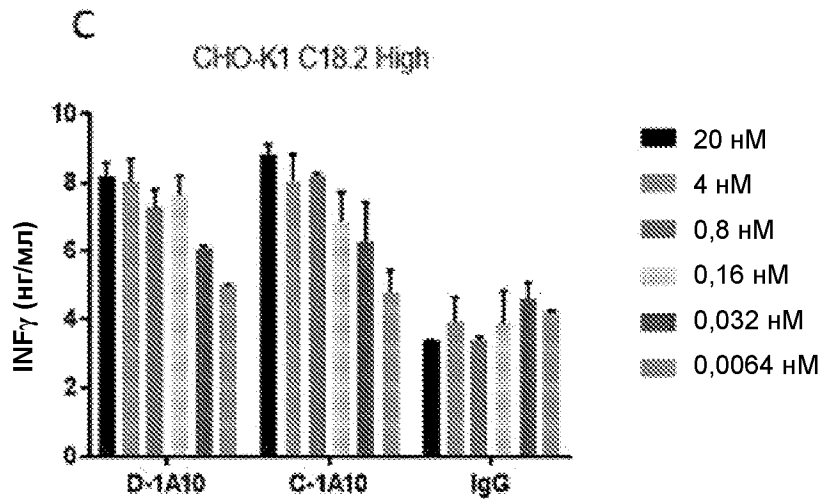
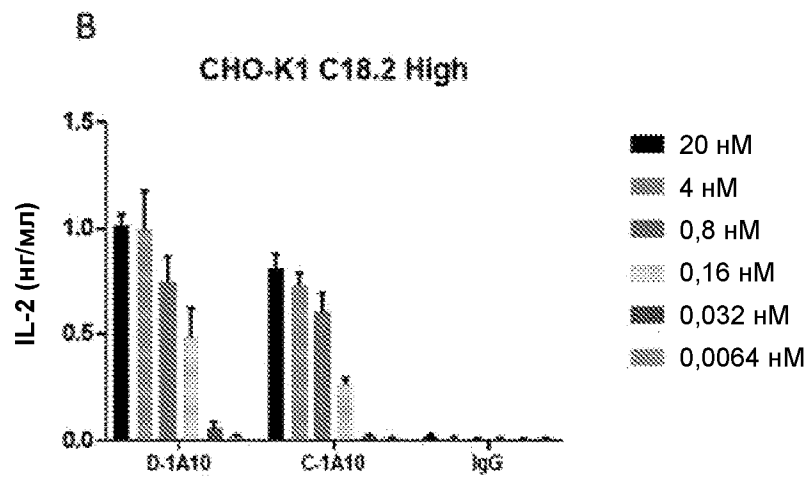
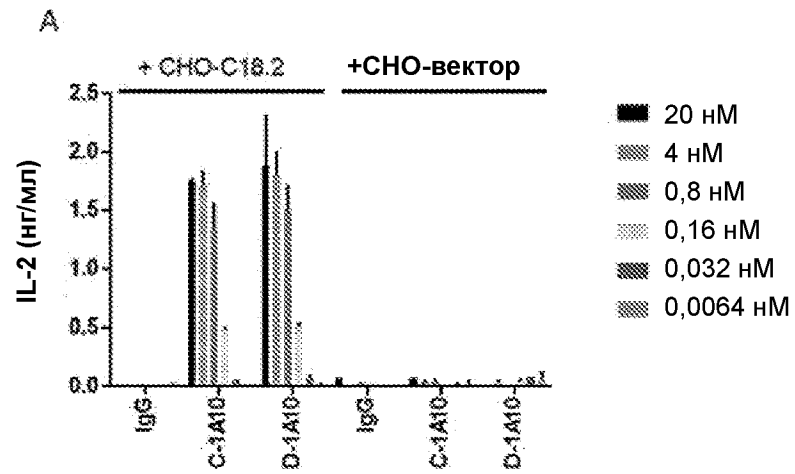
	EC50 (нМ)
C-1A10	0,024
D-1A10	0,025
BMUR	0,25

(продолжение)

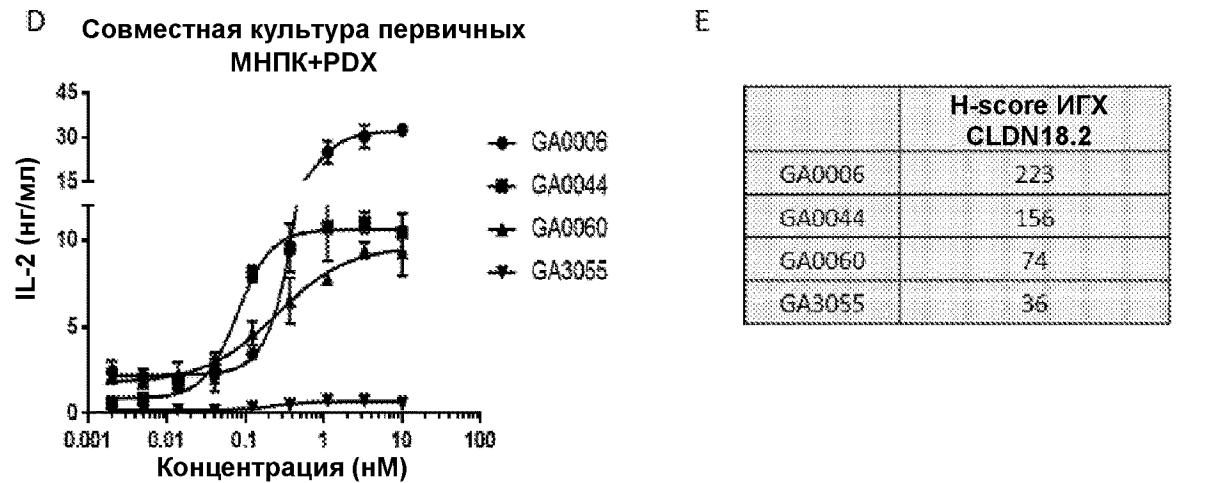


	EC50 (нМ)
BMUR	0,25

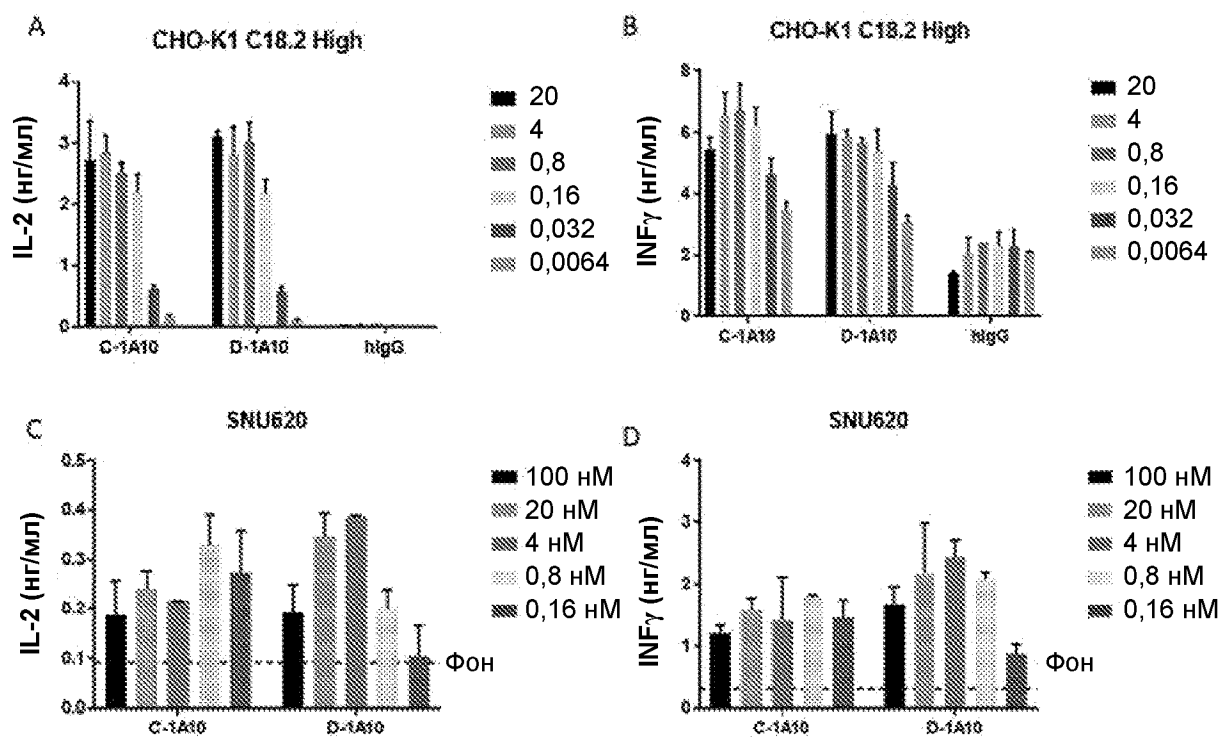
ФИГ. 5



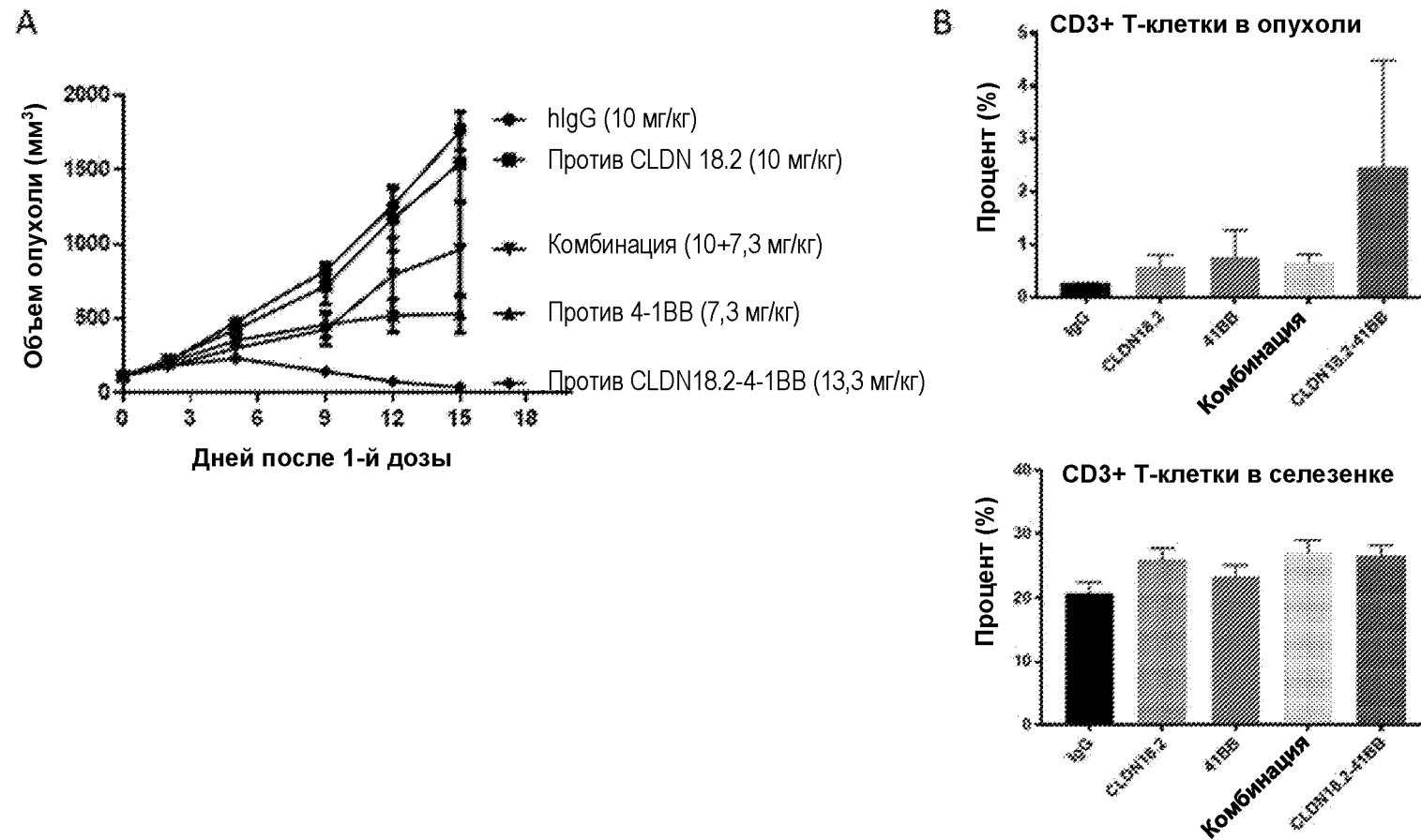
(продолжение)



ФИГ. 6



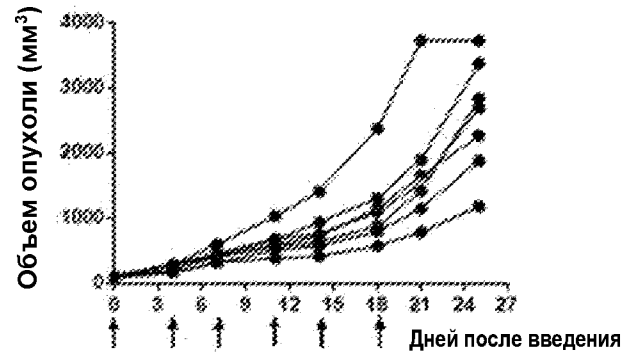
ФИГ. 7



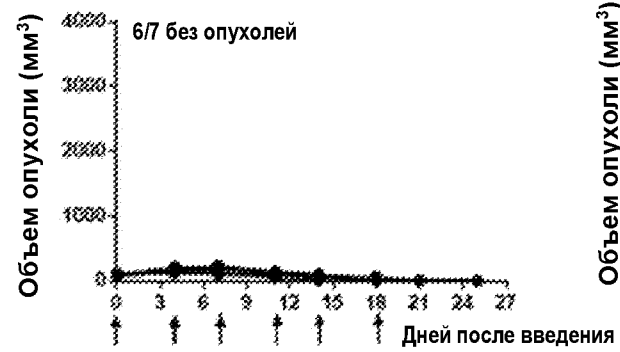
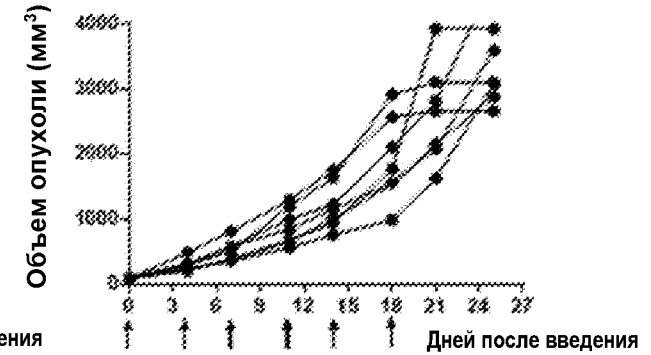
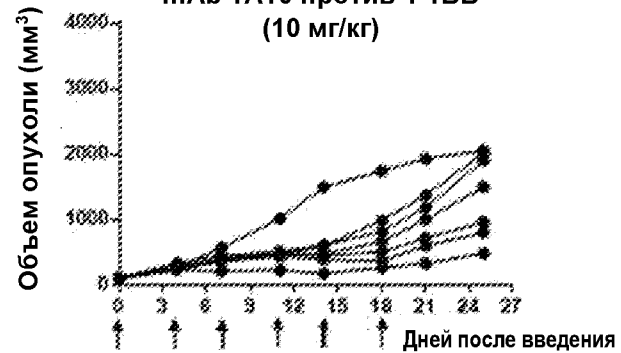
ФИГ. 8

A

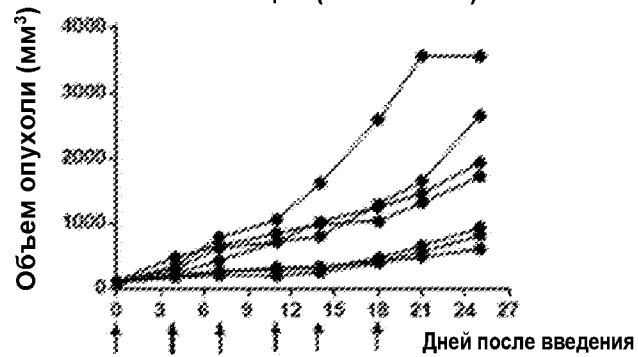
hIgG (10 мг/кг)



C-1A10 (13,3 мг/кг)

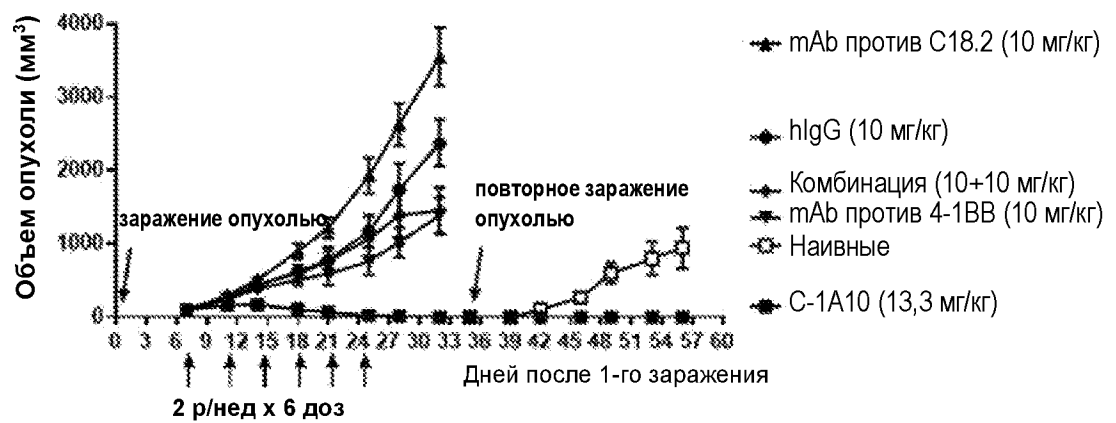
mAb C против CLDN18.2
(10 мг/кг)mAb 1A10 против 4-1BB
(10 мг/кг)

Комбинация (10+10 мг/кг)

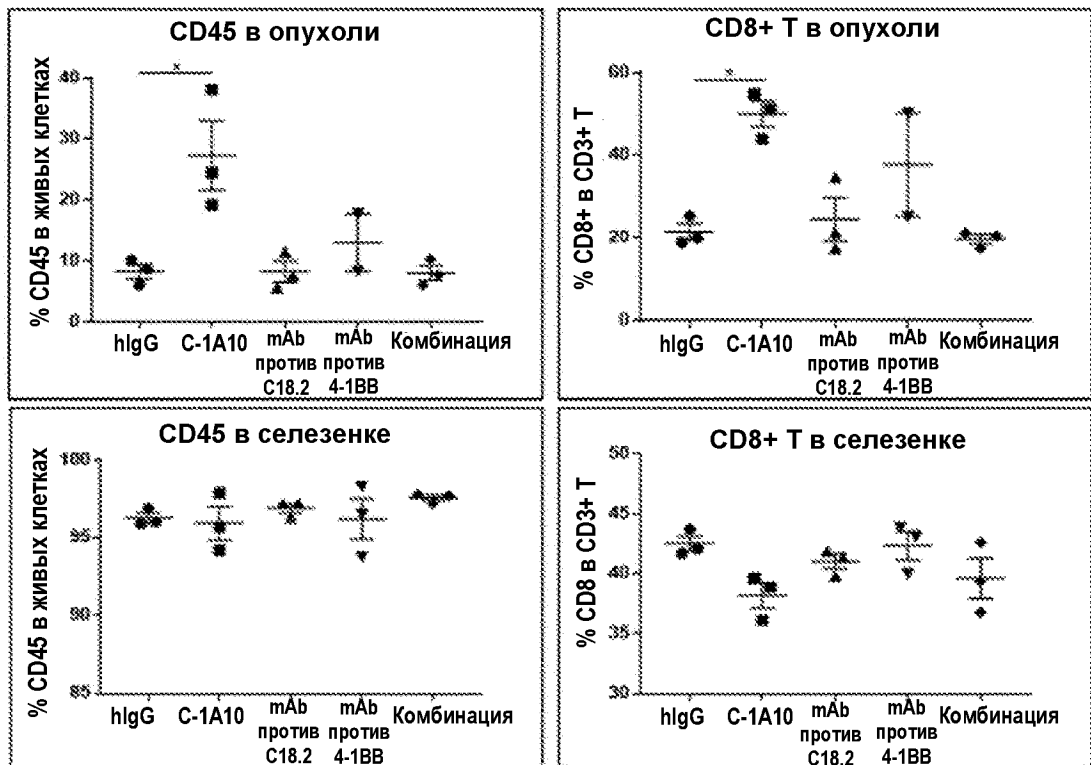


(продолжение)

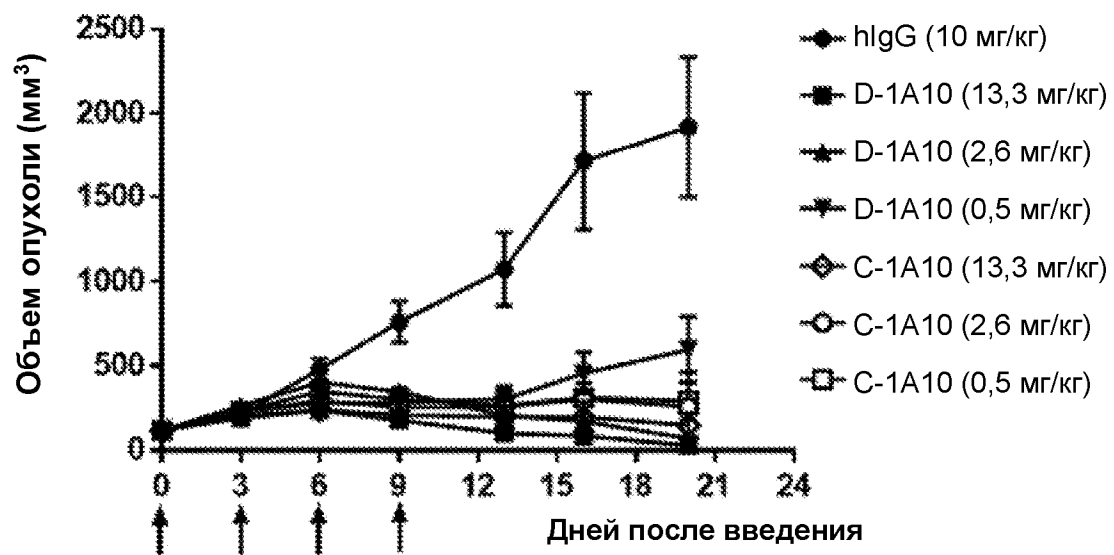
В



С



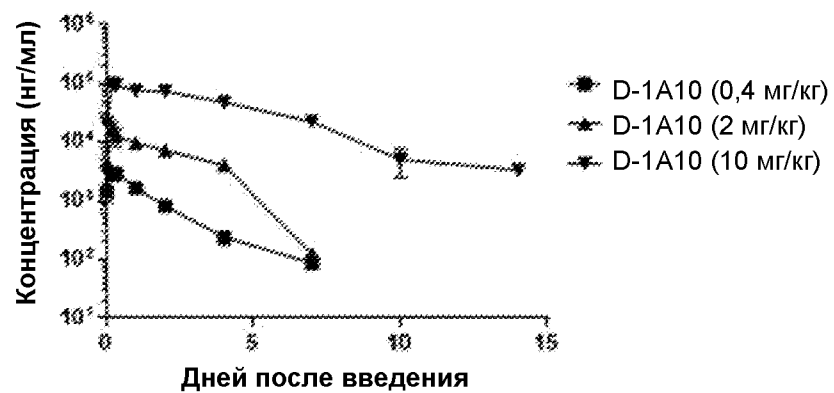
ФИГ. 9



ФИГ. 10

А

Фармакокинетический профиль



В

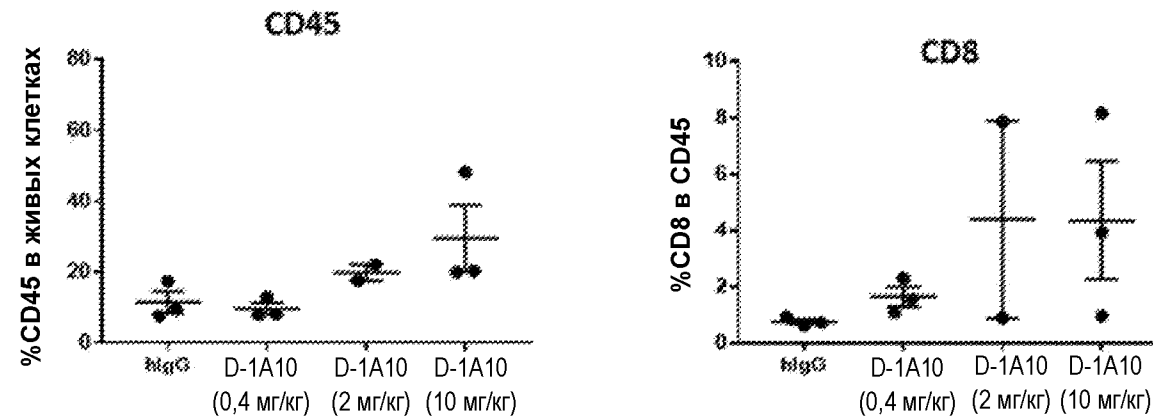
ФК параметр	Единицы	D-1A10 (в/б)		
		0,4 мг/кг	2 мг/кг	10 мг/кг
t _{1/2}	ч	26,5±5,75	28,1±8,91	65,2±25,4
T _{max}	ч	4~8	4~6	4~8
C _{max}	нг/мл	2880±583	13100±8320	100000±13400
AUC(0-t)	ч*нг/мл	113000±34600	707000±479000	10000000±690000
AUC(0-inf)	ч*нг/мл	118000±34900	1000000±12400	11300000±1300000
V _d	мл/кг	133±26,6	81,1±26,8	81,2±27,7
Cl	мл/ч/кг	3,63±1,04	1,99±0,0249	0,897±0,110
MRT _{inf}	ч	36,2±7,14	49,8±5,25	103±23,9

(продолжение)

C



D



ФИГ. 11