

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291668** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.23

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.23

(54) **ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2**

(31) 19219359.7; 20152510.2

(32) 2019.12.23; 2020.01.17

(33) EP

(86) PCT/EP2020/087735

(87) WO 2021/130291 2021.07.01

(71) Заявитель:
СОТИО БАЙОТЕК А.С. (CZ)

(72) Изобретатель:

Баммерт Лукас (CH), Кырыч
Садилкова Ленка, Хоскова Симона,
Ива Валентова (CZ), Вальдмайер
Лоренц, Берли Роже (CH), Мебиус
Ульрих (DE)

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

(57) Изобретение относится к опухолеспецифическим антителам против CLDN18.2 или их фрагментам. Антитела или их фрагменты демонстрируют повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2. Кроме того, антитела не демонстрируют перекрестную реактивность в отношении CLDN18.1. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и медицинскому применению.

A1

202291668

202291668

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574575EA/032

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КЛАУДИНА 18.2

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Плотные контакты являются мультибелковыми комплексами, соединяющими смежные эпителиальные или эндотелиальные клетки с образованием барьера, предотвращая прохождение молекул между клетками и помогая поддерживать полярность клеток и тканей. Плотные контакты состоят из трех основных групп трансмембранных белков: клаудинов и окклюдина, белков цитоплазматических бляшек и цингулина. Они также содержат цитоскелетные и сигнальные белки, например, актин, миозин II и РКСЗ. Эти белки взаимодействуют, поддерживая структуру плотного контакта (Yu and Turner, 2008).

Клаудины образуют семейство из 23 белков (Hewitt, Agarwal and Morin, 2006). Клаудин 18 является белком человека, кодируемым геном CLDN18 и образующим тяжи плотного контакта в эпителиальных клетках. CLDN18 человека может подвергаться альтернативному сплайсингу с двумя альтернативными первыми экзонами, что приводит к образованию двух изоформ белка, CLDN18.1 (или клаудина 18.1) и CLDN18.2 (или клаудина 18.2). CLDN18.2 впервые описан как белок Zsig28 в WO2000/015659. Две изоформы отличаются 69 N-концевыми аминокислотами, включающими первую внеклеточную петлю. Первый внеклеточный домен пролегает от аминокислоты 28 до аминокислоты 80. В этом тяже есть различия в 8 аминокислот между CLDN18.1 и CLDN18.2. Две разные изоформы экспрессируются в разных тканях, при этом CLDN18.1 преимущественно экспрессируется в ткани легких, в то время как CLDN18.2 демонстрирует специфичность в отношении желудка (Niimi et al., 2001). Экспрессия CLDN18.2 в нормальном желудке ограничена дифференцированными короткоживущими клетками эпителия желудка. Экспрессия CLDN18.2 дополнительно определена в различных опухолевых тканях. Например, обнаружено, что CLDN18.2 экспрессируется в опухолях поджелудочной железы, пищевода, яичника и легких, что коррелирует с разными гистологическими подтипами (Sahin et al., 2008). Аминокислотную последовательность белка CLDN18.2 человека можно получать из референсной последовательности в NCBI: NP_001002026.1. Последовательность также приведена как SEQ ID NO: 133.

В свете этого ограниченного профиля экспрессии в нормальных тканях и эктопической экспрессии в злокачественных новообразованиях человека, CLDN18.2 является привлекательной опухолевой мишенью для терапии эпителиальных опухолей антителами. Проведен ряд исследований такой терапии антителами. В WO2004/047863 определены варианты сплайсинга CLDN18 и описан скрининг антител против разных пептидов, полученных из CLDN18.2: пептида DQWSTQDLYN (SEQ ID NO: 57), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2, независящего от гликозилирования; пептида NNPVTAVFNYQ (SEQ ID NO: 58), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2,

преимущественно негликозилированного; и пептида STQDLYNNPVTAVF (SEQ ID NO: 59), N-концевого внеклеточного домена CLDN18.2, негликозилированного. В нем также описаны поликлональные антитела кролика, подвергнутые скринингу с использованием пан-CLDN18 пептида TNFWMSTANMYTG (SEQ ID NO: 60) в С-концевом внеклеточном домене, общем для обеих изоформ CLDN18.1 и CLDN18.2. В WO2005/113587 описаны антитела против специфических эпитопов CLDN18.2, определенных пептидными последовательностями: ALMIVGIVLGAIGLLV (SEQ ID NO: 61) и RIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVS (SEQ ID NO: 62). В WO2007/059997 описаны CLDN18.2-специфические моноклональные антитела, полученные посредством иммунизации пептидом METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQPARRARRTKLGTELGSTPVWWSADGRMDQWS TQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQHSRGR SRRARTKTHLRRGSE (SEQ ID NO: 63), включающим первый внеклеточный домен CLDN18.2 с N- и С-концевыми удлиняющими сегментами. Полученные с помощью этой иммунизации антитела опосредуют цитолиз посредством комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Антитело IMAB362, также известное как клаудиксимаб или золбетуксимаб, описано в WO2007/059997 и WO2016/165762. IMAB362 является антителом IgG1, полученным из моноклонального антитела мыши и химеризованным для экспонирования константной области IgG1 человека для клинического использования. В WO2008/145338 также описано связывание антител с перекрывающимися пептидами в первом внеклеточном домене (MDQWSTQDLYNNPVT (SEQ ID NO: 64), LYNNPVTAVFNYQGL (SEQ ID NO: 65), VFNYQGLWRSCVRES (SEQ ID NO: 66), QGLWRSCVRESSGFT (SEQ ID NO: 67) и RSCVRESSGFTECRG (SEQ ID NO: 68)). В WO2013/167259 описаны антитела, связывающиеся с С-концевыми эпитопами CLDN18.2, для получения антител, нацеленных на С-концевую часть CLDN18.2, для диагностических целей с детекцией экспрессии CLDN18.2 в клетках срезов тканей злокачественных новообразований. Последовательностями двух эпитопов являются TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 69) и EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 70). В WO2013/174509 приведены комбинации антител против CLDN18.2 со средствами, стабилизирующими $\gamma\beta$ -Т-клетки, или средствами, стабилизирующими или повышающими экспрессию CLDN18.2. Антитела можно конъюгировать с терапевтическим веществом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиоактивный изотоп. В WO2014/075788 описан способ лечения злокачественного новообразования с использованием биспецифического антитела, связывающегося с CLDN18.2 и CD3. В WO2014/127906 описаны комбинированные средства, стабилизирующие или повышающие экспрессию CLDN18.2. В WO2016/166122 описаны моноклональные антитела против CLDN18.2, которые могут очень эффективно интернализироваться после связывания с CLDN18.2 и, таким образом, подходят для разработки конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Кроме того, описана конъюгация таких антител с лекарственными средствами

DM4 и MMAE с использованием расщепляемых линкеров SPDB или валина-цитруллина, соответственно. Однако, несмотря на все антитела, описанные в патентных заявках, только химерное IMAB362, описанное в WO2007/059997 и WO2016/165762, в настоящее время тестируют в рамках клинического испытания. В дополнение к этим антителам и ADC, в WO2018/006882 описаны химерные антигенные рецепторы (CAR) на основе моноклональных антител против CLDN18.2. Антитела из WO2018/006882 гуманизировали, и их последовательность описана в разделе "Дополнительные материалы" в Jiang et al., 2018. CAR-T-клетки на основе гуманизованного антитела в настоящее время тестируют в клиническом испытании фазы I (идентификатор на ClinicalTrials.gov: NCT03159819) на пациентах с аденокарциномой желудка на поздней стадии и аденокарциномой поджелудочной железы. В CN109762067 описаны другие моноклональные антитела против CLDN18.2, опосредующие цитоллиз посредством CDC и ADCC. В WO2019/173420 описаны гуманизированные моноклональные антитела против CLDN18.2 с активностью ADCC. В WO2019/175617 описаны моноклональные антитела против CLDN18.2, связывающиеся с иным эпитопом, чем IMAB362. В WO2019/219089 описаны моноклональные антитела, связывающиеся с мутантом CLDN18.2.

Описано, что CLDN18.2 существует в различных конформациях и содержит потенциальный внеклеточный участок N-гликозилирования (см. WO2007/059997, стр 3, первый абзац), что может приводить к теоретически разной топологии/дифференциальному гликозилированию между нормальными и опухолевыми клетками (см. WO2007/059997, стр. 4, второй абзац). Однако ни одно из описанных антител не воздействовало преференциально на CLDN18.2, экспрессирующийся на опухолевых клетках. Т.к. CLDN18.2 экспрессируется не только в опухолях, но также и в здоровой ткани, а именно ткани желудка (Sahin et al., 2008), очевидно, что будет полезно иметь антитела, нацеленные только на CLDN18.2, экспрессирующийся в опухолях, во избежание проблем с безопасностью и побочных эффектов, зачастую ассоциированных с целевым эффектом терапевтических антител в отношении здоровых органов/тканей (Hansel et al., 2010), в частности, как описано для IMAB362 (Sahin et al., 2018; Tureci et al., 2019).

В дополнение к связыванию с мишенями с высокой аффинностью, терапевтические антитела должны сохранять свои желаемые свойства во время разработки, получения, хранения и клинического использования (in vivo). Стабильность антитела может быть подвержена риску при посттрансляционных модификациях (PTM) (Lu et al., 2019; Gervais, 2016). Т.к. неконтролируемые PTM могут приводить к получению антител с эффективностью, активностью, мощностью или стабильностью меньше желаемой, таким образом, очень важно при разработке терапевтических антител конструировать их с минимальными возможными PTM. PTM также могут иметь сильный эффект в отношении нормативно-правового признания, научно-технического обмена или процессов и разработки биосимиляров. Преобладающими модификациями являются окисление, дезамидирование и изомеризация. Кроме того, IMAB362 является химерным антителом,

все еще имеющим удлиненную последовательность мыши, что может приводить у некоторых пациентов к образованию антитела против лекарственных средств, которые, например, после повторного использования, могут приводить к снижению эффективности лечения.

Таким образом, существует потребность в улучшенных антителах, специфических в отношении CLDN18.2, для использования в лечении пациентов с опухолями.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

"Антитела" или "антитело", также обозначаемые как "иммуноглобулины" (Ig), как правило, содержат четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), и, таким образом, являются мультимерными белками или содержат их эквивалентный Ig-гомолог (например, антитело верблюдовых, содержащее только тяжелую цепь, однодоменные антитела (sdAb) или нанотело, которое можно получать из тяжелой или легкой цепи). Термин "антитела" включает связывающий белок на основе антитела, формат модифицированного антитела, сохраняющий целевую связывающую способность. Термин "антитела" также включает полноразмерные функциональные мутанты, варианты или их производные (включая, в качестве неограничивающих примеров, мышинные, химерные, гуманизированные и полностью человеческих антител), сохраняющие необходимые эпитоп-связывающие признаки молекулы Ig, и включает Ig с двойной специфичностью, биспецифические Ig, мультиспецифические Ig и Ig с двойными переменными доменами. Молекулы Ig могут принадлежать любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) и аллотипу. Молекулы Ig также можно подвергать мутагенезу, например, для повышения или снижения аффинности к рецепторам Fc γ или неонатальному Fc-рецептору (FcRn).

В рамках изобретения термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере одну полипептидную цепь, полученную из антитела, не являющейся полноразмерной и демонстрирующей целевое связывание. Фрагменты антител могут связываться с тем же эпитопом или мишенью, что и соответствующее им полноразмерное антитело. Фрагменты антител включают, в качестве неограничивающих примеров, (i) Fab-фрагмент, являющийся моновалентным фрагментом, состоящим из переменного домена легкой цепи (VL), переменного домена тяжелой цепи (VH), константного домена легкой цепи (CL) и константного домена тяжелой цепи 1 (CH1); (ii) F(ab')₂-фрагмент, являющийся бивалентным фрагментом, содержащим два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области (восстановление F(ab')₂-фрагмента приводит к образованию двух Fab'-фрагментов со свободной сульфгидрильной группой); (iii) часть тяжелой цепи Fab (Fa)-фрагмента, состоящая из доменов VH и CH1; (iv) переменный фрагмент (Fv), состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) доменный фрагмент антитела (dAb), содержащий один переменный домен; (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR); (vii) одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); (viii) диатело, являющееся бивалентным, биспецифическим антителом, в

котором домены VH и VL экспрессируются на единой полипептидной цепи, но с использованием линкера, слишком короткого для спаривания между двумя доменами на одной цепи, таким образом, заставляющего домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и приводящего к образованию двух антигенсвязывающих участков; (ix) линейное антитело, содержащее пару тандемных F_v-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей; (x) иммуноглобулин с двойным варибельным доменом; (xi) другие неполноразмерные части тяжелых и/или легких цепей иммуноглобулина или их мутанты, варианты или производные, в отдельности или любой комбинации.

В рамках изобретения "связывающий белок на основе антитела" может представлять собой любой белок, содержащий по меньшей мере один иммуноглобулиновый домен VH, VL или CH, полученный из антитела, в контексте других неиммуноглобулиновых или полученных не из антитела компонентов. Такие белки на основе антитела включают, в качестве неограничивающих примеров, (i) Fc-слитые белки связывающих белков, включая рецепторы или рецепторные компоненты со всеми иммуноглобулиновыми доменами CH или их частями, (ii) связывающие белки, в которых домены VH и/или VL связаны с альтернативными молекулярными каркасами, или (iii) молекулы, в которых иммуноглобулиновые домены VH, и/или VL, и/или CH комбинируют и/или собирают в таком виде, в котором они не встречаются в природных антителах или фрагментах антител.

В рамках изобретения термин "модифицированный формат антитела" включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), полиалкиленоксид-модифицированный scFv, монотела, диатела, антитела верблюдовых, доменные антитела, би- или трицептифические антитела, IgA или две структуры IgG, соединенные J-цепью, и секреторный компонент, антитела акул, каркас обезьян Нового света и не принадлежащие обезьянам Нового Света CDR, антитела IgG4 с удаленной шарнирной областью, IgG с двумя дополнительными участками связывания, сконструированными в доменах CH3, антитела с измененной Fc-областью для повышения или снижения аффинности к рецепторам Fc-гамма, димеризованные конструкции, содержащие CH3, VL и VH, и т.п.

В отношении описанных антител используют схему нумерации Kabat (Martin and Altmann, 2014).

Когда в настоящем описании и формуле изобретения используют термин "содержащий", он не означает исключения других элементов. В целях по настоящему изобретению термин "состоящий из" считают предпочтительным вариантом термина "содержащий из". Если далее в настоящем описании группу определяют как содержащую по меньшей мере некоторое количество вариантов осуществления, это также следует понимать как описание группы, предпочтительно состоящей только из этих вариантов осуществления.

Термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если конкретно не указано иное.

Технические термины используют в их общепринятом смысле. Если некоторым терминам передано конкретное значение, определения терминов будет дано далее в контексте, в котором термины используют.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения неожиданно идентифицировали новые антитела против CLDN18.2, как описано в следующих вариантах осуществления, демонстрирующие повышенное связывание с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, по сравнению со здоровыми клетками желудка, экспрессирующими CLDN18.2, и/или имеющие улучшенную стабильность, и/или являющиеся гуманизированными, при этом сохраняющими свои улучшенные свойства.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью, экспрессирующей CLDN18.2. В одном из вариантов осуществления здоровые клетки или ткань, используемые для сравнения, являются здоровыми клетками желудка или здоровой тканью желудка.

Повышенное связывание антитела или его фрагмента, представленного в настоящем описании, с опухолевой тканью можно продемонстрировать биоаналитическими способами, такими как проточная цитометрия (FC) или иммуногистохимия (ИНС), как показано в примерах 4 и 5, соответственно. Опухоль, экспрессирующую CLDN18.2, можно получать посредством подкожной инъекции мыши Balb/c CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549. CLDN18.2-экспрессирующие клетки A549 можно получать, как показано в примере 4, и они доступны под регистрационным номером DSM ACC3360 и депонированы на 6 декабря 2019 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig DE. Здоровую ткань (например, здоровую ткань желудка) также можно получать из мыши, несущей опухоль. Таким образом, повышенное связывание с опухолевой тканью относительно здоровой ткани можно продемонстрировать на опухолевой ткани и здоровой ткани, полученных из одного животного.

Повышенное связывание с CLDN18.2, экспрессирующимся в опухолевой ткани, может являться результатом посттрансляционной модификации, такой как дифференциальное гликозилирование CLDN18.2, или неправильного фолдинга CLDN18.2 по сравнению с CLDN18.2, экспрессирующимся в здоровой ткани.

Для тестирования связывания антитела в качестве биоаналитического способа можно использовать проточную цитометрию (FC). Процент CLDN18.2-положительных клеток, например, можно измерять посредством FC с помощью специфического антитела против CLDN18.2. Другим возможным показателем связывания, например, может

являться соотношением процентной доли CLDN18.2-положительных клеток в образце опухолевых клеток и процентной доли CLDN18.2-положительных клеток в образце клеток, полученном из здоровой ткани, такой как здоровая ткань желудка. Повышенное связывание антитела с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, полученными из CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549, по сравнению со здоровыми клетками, такими как здоровые клетки желудка, можно продемонстрировать с помощью соотношения >2 , >5 , ≥ 10 , предпочтительно - ≥ 15 , и более предпочтительно - ≥ 20 .

Повышенное связывание антитела с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, полученными из CLDN18.2-экспрессирующих клеток A549, по сравнению со здоровыми клетками, такими как здоровые клетки желудка, также можно описать, демонстрируя, что антитело связывается с в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, предпочтительно - по меньшей мере 15 раз, предпочтительно - по меньшей мере 20 раз большим количеством опухолевых клеток, чем здоровых клеток, таких как здоровые клетки желудка.

Для тестирования связывания антитела в качестве биоаналитического способа можно использовать иммуногистохимию (ИНС). Образец ткани, используемый для ИНС, предпочтительно, необходимо подвергать быстрой заморозке после резекции, а после размораживания фиксировать в ацетоне, например, как показано в примере 5. Т.к. CLDN18.2 является белком плотного контакта в здоровой ткани, положительное окрашивание на CLDN18.2 должно приводить к визуализации преимущественно мембранного окрашивания области контакта между клетками в здоровой ткани и/или опухолевой ткани. Таким образом, отрицательное окрашивание CLDN18.2 или слабое окрашивание должно приводить к отсутствию мембранного окрашивания.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 со значением полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) выше 0,4 мкг/мл, выше 0,5 мкг/мл, предпочтительно - выше 0,6 мкг/мл, но не выше 1 мкг/мл при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC) на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки HEK293T, гиперэкспрессирующие CLDN18.2, можно получать, как описано в примере 3. Значение EC_{50} антитела по изобретению при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC) на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, может составлять от 0,4 до 1 мкг/мл, от 0,5 до 1 мкг/мл или, предпочтительно, от 0,6 до 1 мкг/мл.

Альтернативно, значение EC_{50} антитела по изобретению можно сравнивать со значением EC_{50} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, где значение EC_{50} антитела по изобретению составляет в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, предпочтительно - по меньшей мере 1,5 раза, более предпочтительно - по меньшей мере 2 раза, даже более предпочтительно - по меньшей мере 2,5 раза выше значения EC_{50} IMAB362, но не более, чем в 5 раз выше значения EC_{50} IMAB362. Значение EC_{50} антитела по изобретению может

составлять в 1,1-2,5 раз, 1,2-2,5 раз, предпочтительно - 1,5-2,5 раз, или более предпочтительно - 2-2,5 раза выше значения EC_{50} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, со значением EC_{50} выше 0,6 мкг/мл, выше 1 мкг/мл, предпочтительно - выше 1,5 мкг/мл, более предпочтительно - выше 2 мкг/мл, но не выше 3 мкг/мл при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High. Клетки PA-TU-8988S-High можно получать, как описано в примере 2. Значение EC_{50} антитела по изобретению при измерении с помощью титрования посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High может составлять от 0,6 до 3 мкг/мл, от 1 до 3 мкг/мл, предпочтительно - от 1,5 до 3 мкг/мл, или более предпочтительно - от 2 до 3 мкг/мл.

Альтернативно, значение EC_{50} антитела по изобретению можно сравнивать со значением EC_{50} IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High, где значение EC_{50} антитела по изобретению составляет в по меньшей мере 1,5 раз, по меньшей мере 2 раза, предпочтительно - по меньшей мере 3 раза, более предпочтительно - по меньшей мере 4 раза выше, но не более чем 5 раз выше значения EC_{50} IMAB362. Значение EC_{50} антитела по изобретению при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High может составлять в 1,5-5 раз, 2-5 раз, 3-5 раз или 4-5 раз выше значения EC_{50} IMAB362.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 со значениями $\max MFI$ в пределах $\pm 40\%$ значения $\max MFI$ IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 со значениями $\max MFI$ в ≤ 2 раз выше значения $\max MFI$ IMAB362 при измерении посредством проточной цитометрии на клетках PA-TU-8988S-High.

Антитело или его функциональный фрагмент с повышенным связыванием с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, может обладать терапевтическими преимуществами по сравнению с антителами, неспособными различать здоровую ткань, экспрессирующую CLDN18.2, и опухолевую ткань, экспрессирующую CLDN18.2. Опухолеспецифические антитела могут не приводить к проблемам с безопасностью и побочным эффектам, зачастую ассоциированным с целевым эффектом терапевтических антител в здоровых органах/тканях (Hansel et al., 2010). Такие нежелательные эффекты описаны, например, для IMAB362 (Sahin et al., 2018; Tureci et al., 2019).

Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему последовательности определяющей комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ

ID NO: 23, соответственно, и последовательности CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно.

Изобретение также относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему последовательность HCDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и последовательность LCDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 26.

Соответствующие консенсусные последовательности можно найти в таблице 1. Следует понимать, что любое антитело или его фрагмент на основе любой комбинации CDR, полученных из консенсусных последовательностей и связывающихся с CLDN18.2, является частью изобретения.

Таблица 1: Консенсусные последовательности CDR выделенного антитела

CDR	Последовательность	SEQ ID
HCDR1	DYAMX X в 5-ом положении является H или Y	SEQ ID NO: 21
HCDR2	WINXYTGKPTYXXXFXG X в 4-ом положении является T или A; X в 12-ом положении является A или S; X в 13-ом положении является D или Q; X в 14-ом положении является D или K; X в 16-ом положении является K или Q	SEQ ID NO: 22
HCDR3	AVXYGYTMDA X в 3-ем положении является F или Y	SEQ ID NO: 23
LCDR1	RXSEDIYSNXA X во 2-ом положении является A или T; X в 10-ом положении является L или F	SEQ ID NO: 24
LCDR2	XXXRLQD X в 1-ом положении является S или A; X во 2-ом положении является V или I; X в 3-ем положении является K или N	SEQ ID NO: 25
LCDR3	LQGSXFPLT X в 5-ом положении является K или N	SEQ ID NO: 26

Связывание антитела или аффинность связывания, как правило, выражают в терминах равновесных констант ассоциации или диссоциации (K_a или K_d , соответственно), которые, в свою очередь, являются обратными соотношениями констант скорости диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} , соответственно). Таким образом, эквивалентные аффинности могут соответствовать разным константам скорости, при условии, что соотношение констант скорости остается одинаковым. Аффинности связывания и/или константы скорости можно определять способами, хорошо известными

в этой области или представленными в настоящем описании, такими как ELISA, титрование с помощью проточной цитометрии, изотермическая титрационная калориметрия (ИТК), Biacore (SPR), интерферометрия биослоя или флуоресцентная поляризация. В некоторых случаях, из-за природы антигена измерение K_a или K_d антител затруднено. Это особенно актуально для интегральных мембранных белков, таких как клаудины (Hashimoto et al., 2018). В таких случаях интегральный мембранный белок может экспрессироваться в виде протеолипосом или липочастиц. Такие липочастицы можно иммобилизовать на пластике и использовать в анализе ELISA для определения аффинности связывания антител с иммобилизованным антигеном. Таким образом, вместо значений K_a или K_d можно вычислять значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) для каждого тестируемого антитела или его функционального фрагмента, отражающие его аффинность связывания (или силу связывания) с антигеном. В примере 2 и на фигуре 1 ниже приведены примеры кривых аффинности при анализе ELISA для антител с CDR, содержащимися в консенсусных последовательностях из таблицы 1. Значение EC_{50} и значение максимального связывания можно использовать для количественного связывания антител с CLDN18.2. Пример 3 ниже относится к вычислению значений EC_{50} посредством проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих CLDN18.2, для антител с CDR, содержащимися в консенсусных последовательностях из таблицы 1.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2 и содержащему последовательности CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 126 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и последовательности CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

d. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

е. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

ф. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

г. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

h. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

i. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к антители или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

б. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно; или

с. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к антители или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

а. последовательность VH SEQ ID NO: 27 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;

б. последовательность VH SEQ ID NO: 29 и последовательность VL SEQ ID NO: 30;

с. последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антители или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

а. последовательность VH SEQ ID NO: 33;

б. последовательность VH SEQ ID NO: 34;

с. последовательность VH SEQ ID NO: 35;

д. последовательность VH SEQ ID NO: 36; или

е. последовательность VH SEQ ID NO: 37;

и

- f. последовательность VL SEQ ID NO: 38;
- g. последовательность VL SEQ ID NO: 39;
- h. последовательность VL SEQ ID NO: 40; или
- i. последовательность VL SEQ ID NO: 41.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

- a. последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - b. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - c. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 39;
 - d. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;
 - e. последовательность VH SEQ ID NO: 35 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - f. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - g. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;
 - h. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - i. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
- или
- j. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 39.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему:

- a. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;
- b. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;
- c. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52;
- d. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;
- e. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;
- f. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;
- g. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;
- h. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;

i. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51; или

j. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и легкая цепь последовательность SEQ ID NO: 52.

Константная область легкой цепи CL и константная область тяжелой цепи CH1 и Fc-область описываемых антител могут иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 128, соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2, состоящему из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51.

Изобретение также относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении аминокислотной последовательности антитела по изобретению, демонстрирующего повышенное связывание с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2, по сравнению со здоровыми клетками желудка, экспрессирующими CLDN18.2.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2 и имеющему аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, содержащего:

a. последовательность VH SEQ ID NO: 27 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;

b. последовательность VH SEQ ID NO: 29 и последовательность VL SEQ ID NO: 30;

c. последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2 и имеющему аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, содержащего:

a. последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;

b. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;

c. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 39;

d. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;

- e. последовательность VH SEQ ID NO: 35 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - f. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - g. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;
 - h. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - i. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
- или
- j. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 39.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, связывающемуся с CLDN18.2 и имеющему аминокислотную последовательность с по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности в отношении антитела, состоящего из последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51.

В другом варианте осуществления Fc-домен антитела (или фрагмента антитела, при его наличии) может содержать модификации или мутации, такие как модификации или мутации, указанные в таблице 2 ниже. Такую модификацию или мутацию можно встраивать для модуляции эффекторной активности Fc-домена антитела. Модификация антител также может включать пептидные метки, добавленные на C-конец цепи HC и/или LC антитела. Такие метки можно использовать, например, для очистки белка или конъюгации белка.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, при этом антитело представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии. В предпочтительном варианте осуществления антитело является антителом типа IgG1. Fc-область иммуноглобулинов взаимодействует со множеством Fcγ-рецепторов (FcγR) и белком комплемента (например, C1q) и опосредует иммунные эффекторные функции, такие как элиминация меченых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). Для терапевтических подходов благоприятным может являться повышение или сайленсинг Fc-ассоциированных эффекторных функций. Тип иммуноглобулина (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) можно выбирать по желаемой эффекторной функции антитела, ассоциированной с Fc-доменом. Также можно использовать синтетический иммуноглобулин, такой как иммуноглобулин с аминокислотами 118-260 IgG2 и аминокислотами 261-447 IgG4 или вариант IgG2 с точечными мутациями из IgG4 (например, H268Q/V309L/A30S/P331S). Такие синтетические иммуноглобулины снижают эффекторные функции антитела. Fc-

сконструированные иммуноглобулины также можно использовать для модуляции эффекторной функции антитела. В таблице 2 приведен пример такого конструирования Fc. Экспрессия в линиях продуцирующих клеток с измененным фукозилированием также может влиять на связывание FcγR.

Таблица 2: Примеры модификаций для модуляции эффекторной функции антитела. Если не указано иначе, мутации внесены в подкласс IgG1 (Wang, Mathieu and Brezski, 2018).

Конструирование и предполагаемая функция	Мутация	Ссылка
<i>Усиление ADCC</i>		
Повышенное связывание FcγRIIIa	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L S239D/I332E S298A/E333A/K334A в одной тяжелой цепи: L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268 D/D270E/S298A, в противоположной тяжелой цепи: D270E/K326D/A330M/K334E	(Stavenhagen et al., 2007) (Lazar et al., 2006) (Shields et al., 2001) (Mimoto et al., 2013)
Повышенное связывание FcγRIIIa сниженное связывание FcγRIIb	S239D/I332E/A330L	(Lazar et al., 2006)
<i>Усиление ADCP</i>		
Повышенное связывание FcγRIIIa, повышенное связывание FcγRIIIa	G236A/S239D/I332E	(Richards et al., 2008)
<i>Усиление CDC</i>		
Повышенное связывание C1q	K326W/E333S S267E/H268F/S324T перекрестный подкласс IgG1/IgG3	(Idusogie et al., 2001) (Moore et al., 2010) (Natsume et al., 2008)
Гексамеризация	E345R/E430G/S440Y	(Diebolder et al., 2014)
<i>Сниженная эффекторная</i>		

<i>функция</i>		
Агликозилированный	N297A, или N297Q, или N297G	(Bolt et al., 1993; Leabman et al., 2013; Tao and Morrison, 1989; Walker et al., 1989)
Сниженное связывание FcγR и C1q	L235E IgG1: L234A/L235A или L234A/L235A/P329G IgG4:F234A/L235A перекрестный подкласс IgG2/IgG4 IgG2: H268Q/V309L/A330S/P331S IgG2: V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	(Alegre et al., 1992) (Xu et al., 2000; Lo et al., 2017) (Xu et al., 2000) (Rother et al., 2007) (An et al., 2009) (Vafa et al., 2014)
<i>Повышенное время полужизни</i>		
Повышенное связывание FcRn при pH 6,0	M252Y/S254T/T256E M428L/N434S	(Dall'Acqua et al., 2002) (Zalevsky et al., 2010)
<i>Повышение совместного вовлечения</i>		
Повышенное связывание FcγRIIb	S267E/L328F	(Chu et al., 2008)
Повышенное связывание FcγRIIa, сниженное связывание FcγRIIIa	N325S/L328F	(Shang et al., 2014)

Время полужизни антител также можно модулировать. Fc-домен играет центральную роль в стабильности антител и времени полужизни в сыворотке. В случае терапевтических подходов, время полужизни антитела можно снижать с использованием фрагмента антитела, в котором Fc-домен отсутствует или усечен, такого как F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc или (scFv)₂. Антитела также могут находиться в форме диател или бивалентных антител. Диатела или бивалентные антитела можно использовать для повышения аффинности к мишени, что делает возможной более низкую дозировку. Функциональные фрагменты, в

которых отсутствует Fc-домен или Fc-домены усечены, также можно использовать в разработке других терапевтических подходов, таких как Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки) или привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE). В конструкциях CAR один домен VH и один домен VL, как правило, соединяют коротким пептидным линкером для образования одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), и scFv-фрагмент дополнительно связывают с трансмембранным доменом и внутрицитоплазматическим Т-клеточным иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (например, из CD3 ζ) и дополнительными доменами костимуляторных молекул (например, из CD28, 4-1BB (CD127) или OX40) (Chang and Chen, 2017). Домены VH и VL, используемые в scFv-фрагменте, могут являться доменами антител, указанными в таблице 3. BiTE, как правило, состоят из слияния двух scFv двух разных антител. Один scFv-домен может являться доменом из выделенных антител, связывающихся с CLDN18.2, указанным в таблице 3, в то время как другой scFv-домен получают из антитела, связывающегося, например, с CD3, CD16, NKG2D, NKp46, CD2, CD28 или CD25. Подробное руководство по формату антител BiTE и других форматов биспецифических антител, используемых для перенаправления Т-клеток, можно найти в обзоре Diego Ellerman (2019).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, антителу, имеющему константную область легкой цепи (CL) SEQ ID NO: 127 и, предпочтительно, константную область тяжелой цепи CH1 и Fc-область SEQ ID NO: 129 со сниженным связыванием с Fc γ R, имеющему мутации L234A/L235A в константной области тяжелой цепи CH2. Более предпочтительно, изобретение относится к антителу с константной областью тяжелой цепи CH1 и Fc-областью SEQ ID NO: 130, имеющему мутацию L234A/L235A/P329G в константной области тяжелой цепи CH1 и Fc-область с даже более сниженным связыванием с Fc γ R.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, содержащему последовательность VH SEQ ID NO: 33, последовательность VL SEQ ID NO: 38, константную область легкой цепи (CL) SEQ ID NO: 127, константную область тяжелой цепи CH1 и Fc-область SEQ ID NO: 129 с L234A/L235A.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, состоящему из последовательности VH SEQ ID NO: 33, последовательности VL SEQ ID NO: 38, константной области легкой цепи (CL) SEQ ID NO: 127, константной области тяжелой цепи CH1 и Fc-области SEQ ID NO: 129 с L234A/L235A.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент является гуманизированным. Гуманизация моноклональных антител хорошо известна. В *The Handbook of Therapeutic Antibodies, Second Edition*, приведена исчерпывающая информация о гуманизации моноклональных антител (Saldanha, 2014),

биоинформатических инструментах для анализа таких антител (Martin and Allemn, 2014) и разработке и производстве терапевтических антител (Jacobi et al., 2014).

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент является выделенным антителом или выделенным фрагментом, связывающимся с CLDN18.2.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент не связывается с CLDN18.1. Таким образом, антитело не демонстрирует с перекрестной реактивности или перекрестного связывания с CLDN18.1. Связывание антитела с белком-мишенью можно тестировать посредством проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих белок-мишень. Специфическое связывание тестируемого антитела с его белком-мишенью можно визуализировать на гистограмме. Такой график приводит к пику с высоким сигналом флуоресценции, когда антитело специфически связывается с экспрессируемым белком-мишенью, и к пику с низким сигналом флуоресценции, когда антитело не связывается или лишь очень слабо связывается с экспрессируемым белком-мишенью. Степень связывания также можно выразить на столбиковой диаграмме, на которой показана максимальная средняя интенсивность флуоресценции (maxMFI), измеренная посредством проточной цитометрии, при этом высокая maxMFI отражает сильное связывание, и низкая/отсутствующая maxMFI отражает отсутствие связывания или очень слабое связывание. Сравнение значений maxMFI для разных антител в одних экспериментальных условиях также может свидетельствовать об аффинности антител к мишени, при этом более высокая maxMFI свидетельствует о более низкой скорости обратной реакции и более высокой аффинности. Примеры таких анализов связывания можно найти в примере 3 и на фигурах 4 и 5.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, при этом антитело связывается с другим веществом. Связывание антитела или его фрагмента с другим остатком может являться ковалентным или нековалентным. Вещество может включать радиоактивные изотопы, флуоресцентные метки, гистологические маркеры, цитотоксины или цитокины. Ковалентное связывание остатка с антителом можно облегчать с помощью линкеров, известных в этой области.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к опухолеспецифическому антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело менее склонно к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAV362. В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к опухолеспецифическому антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, где антитело не подвергается посттрансляционному дезамидированию. Посттрансляционные модификации (PTM) являются важной проблемой при разработке, получении и хранении антител. Неконтролируемые PTM могут приводить к получению антител с меньшей эффективностью, активностью, мощностью или стабильностью. PTM могут представлять собой N-гликозилирование, гликирование лизина, цистеины, кэпированные другими

цистеинами, глутатион или другие сульфгидрил-содержащие соединения из сред для культивирования клеток во время биотехнологической обработки или образование димеров и олигомеров более высокого порядка из-за цистеинов, связанных ковалентными дисульфидными мостиками. Среди РТМ, дезамидирование остатков аспарагина (Asn, N), изомеризация остатков аспартата (аспарагиновой кислоты, Asp, D) и образование промежуточных сукцинимидных соединений являются самыми частыми реакциями модификации в случае терапевтических антител во время получения, хранения или после введения *in vivo*. Дезамидирование Asn и изомеризация Asp зависят от предрасположенности последовательности, структурного окружения и условий хранения, в частности, pH раствора и температуры хранения. Эти модификации могут приводить к снижению или даже потере функции или биологической активности, особенно если затронутые остатки участвуют в связывании мишени. Остатки Asn и Asp имеют риск модификаций, особенно когда они находятся в структурно гибких областях, таких как петли CDR, и когда соблюдены некоторые другие структурные условия, в то время как показано, что каркасные области являются сравнительно устойчивыми к модификациям. В дополнение к структурной локализации остатков Asn и Asp, также идентифицированы канонические мотивы дезамидирования Asn и изомеризации Asp. Этими каноническими мотивами являются NG, NS, NN, NT, NH и DG, DS, DD, DT и DH, соответственно (Lu et al., 2019). После анализа *in silico* описанные антитела демонстрируют мотив Asp-изомеризации DG в последней аминокислоте CDR2 домена VL и в областях CH2 и CH3 HC (VL-CDR2 (в положении 62), CH2 (в положении 282), CH3 (в положении 403)).

Изомеризацию Asp можно тестировать, подвергая антитела воздействию низкого pH (т.е. pH 5,5) и нагревания (т.е. 40°C) в течение двух недель, в то время как дезамидирование Asn антител можно тестировать, подвергая антитела воздействию высокого pH (т.е. pH 8,0) и нагревания (т.е. 40°C) в течение одной недели, имитируя условия производства и хранения.

Авторы настоящего изобретения показали, что описанные антитела в этих жестких условиях хоть и содержат Asn и Asp в своих CDR и несут мотив Asp-изомеризации Asp-Gly (DG), неожиданно не имели дезамидирования Asn (см. таблицу 6) и изомеризации Asp (см. таблицу 7), и что их аффинность связывания с CLDN18.2 не была затронута. С другой стороны, IMAV362 демонстрировало дезамидирование Asn в таких условиях, вызывающее потерю аффинности связывания (как видно в таблице 6 и на фигуре 10). Таким образом, настоящее изобретение относится к выделенным антителам или их фрагментам, связывающимся с CLDN18.2 и менее восприимчивым, чем IMAV362, к РТМ во время получения, хранения и клинического использования (*in vivo*), что гарантирует сохранение аффинности связывания с CLDN18.2 во время получения, хранения и клинического использования (*in vivo*).

Изобретение также относится к антителу, связывающемуся с тем же эпитопом, что и антителу, представленное в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления

антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51.

Изобретение дополнительно относится к антителу, конкурирующему за связывание с антителом, представленным в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание с антителом, содержащим последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51.

Изобретение дополнительно относится к антителу, конкурентно ингибирующему связывание антитела, представленного в настоящем описании, с клаудином 18.2. В одном из вариантов осуществления антитело конкурентно ингибирует связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51, с клаудином 18.2.

Подходящие способы детекции связывания антител с одним и тем же антигеном включают подходы для картирования взаимодействий антиген-антитело. Такие подходы описаны в Abbott, 2014 (Abbott, Damschroder and Lowe, 2014). Подходящие способы детекции конкуренции включают конкурентные анализы посредством биннинг эпитопов, как описано в Abdiche, 2009 (Abdiche et al., 2009). Подходящий способ детекции конкурентного ингибирования включает анализы ELISA.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, кодирующим выделенные опухолеспецифические антитела или их функциональные фрагменты, связывающиеся с CLDN18.2. Последовательности нуклеиновой кислоты могут кодировать CDR в отдельности, области VH и VL или целые тяжелые и легкие цепи антител. Эти последовательности нуклеиновой кислоты можно найти в таблице 3. Последовательность нуклеиновой кислоты также может кодировать F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентный антитело или их Fc-сконструированные версии. Кодированный иммуноглобулин может являться IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетическим IgG, IgM или их мутантными и Fc-сконструированными версиями.

В еще одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты также может кодировать конструкцию CAR, связывающуюся с CLDN18.2. Всестороннее руководство по конструированию CAR-T-клеток можно найти в Chang and Chen (2017) или June and Sadelain (2018). В одном из вариантов осуществления изобретение относится к T-клетке, генетически сконструированной для продуцирования искусственного T-клеточного рецептора, например, химерного антигенного рецептора (CAR), где искусственный T-клеточный рецептор содержит антитело или его функциональные фрагмент по настоящему изобретению, связывающееся с CLDN18.2.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к опухолеспецифическому связывающему белку на основе антитела, специфически связывающемуся с CLDN18.2. Такой связывающий белок может содержать по меньшей

мере CLDN18.2-связывающий домен описанных антител и другой белковый домен, не относящийся к антителам. Изобретение также относится к модифицированному формату антител, связывающемуся с CLDN18.2.

Изобретение также относится к экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по изобретению или вырожденную нуклеиновую кислоту в результате вырожденности кодонов. Экспрессирующий вектор может являться экспрессирующим вектором для экспрессии белков в клетках млекопитающих, бактерий, грибов или насекомых, и выбран по типу клетки-хозяина, несущей экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела или их функциональные фрагменты. Всестороннее руководство по конструированию таких векторов можно найти в Green and Sambrook (Green and Sambrook, 2012).

В другом варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту или экспрессирующий вектор по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может являться клеткой млекопитающего или линией клеток, бактериальной клеткой, клеткой гриба или клеткой насекомого.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его фрагмент, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, или клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор, для использования в лечении индивидуума, страдающего неопластическим заболеванием.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу или его фрагменту, связывающемуся с CLDN18.2, нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его фрагмент, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, или клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновую кислоту или вектор, для использования в лечении индивидуума, имеющего риск развития неопластического заболевания, и/или для использования в лечении индивидуума, у которого диагностировано неопластическое заболевание.

Описанные антитела или их фрагменты можно использовать в качестве монотерапии. В предпочтительном варианте осуществления описанные антитела или их фрагменты используют в комбинации с установленным стандартом лечения неопластического заболевания.

Неопластическое заболевание может являться по меньшей мере одним заболеванием, выбранным из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких. Следует понимать, что неопластическое заболевание, подлежащее лечению, экспрессирует CLDN18.2.

В одном из вариантов осуществления индивидуум представляет собой млекопитающего. В предпочтительном варианте осуществления индивидуум является человеком.

Другой вариант осуществления изобретения относится к способу лечения неопластического заболевания, включая рак поджелудочной железы, рак желудка, рак

пищевода, рак яичника и рак легких, с использованием антитела или его функционального фрагмента, связывающегося с CLDN18.2, где способ включает введение фармацевтически эффективного количества антитела или его функционального фрагмента нуждающемуся в этом индивидууму. Способ лечения может представлять собой монотерапию или, предпочтительно, комбинированное лечение с использованием установленного стандарта лечения неопластического заболевания.

Аминокислотную последовательность белка CLDN18.2 человека можно получать из референсной последовательности NCBI: NP_001002026.1. Последовательность также приведена как SEQ ID NO: 133.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Оценка связывания с липочастицами, содержащими CLDN18.2, или нуль-липочастицами выбранных химерных и гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством ELISA, как указано. А. Химерные антитела сC11-1, сC11-2, сC11-3, IMAB362 и только вторичное антитело; В. гуманизированные антитела hC11a-hC11j, химерное сC11-1, IMAB362 и только вторичное антитело. Все недавно полученные антитела связываются с липосомальным CLDN18.2.

Фигура 2: Сортировка клеток PA-TU-8988S по уровням экспрессии CLDN18.2. А. Профиль FC PA-TU-8988S, окрашенных с помощью IMAB362. В. Профиль FC клеток PA-TU-8988S, сортированных посредством FACS по высокой экспрессии CLDN18.2.

Фигура 3: Получение клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих huCLDN18.2. Клетки HEK293T, неэкспрессирующие CLDN18.2 эндогенно, трансфицировали с помощью плазмиды, кодирующей huCLDN18.2 для стабильной экспрессии CLDN18.2 или кодирующей huCLDN18.1 для стабильной экспрессии CLDN18.1. Экспрессию анализировали посредством FC после окрашивания с помощью IMAB362 и антитела против пан-CLDN18.1 или только вторичного антитела против IgG человека. А. Профиль FC нетрансфицированных клеток HEK293T. В. Профиль FC трансфицированных клеток HEK293T, стабильно экспрессирующих CLDN18.1. С. Профиль FC трансфицированных клеток HEK293T, стабильно экспрессирующих CLDN18.2.

Фигура 4: Анализ связывания посредством проточной цитометрии химерных антител сC11-1, сC11-2 и сC11-3 с пре-B-клетками L11, гиперэкспрессирующими CLDN18.1 или CLDN18.2. Химерные антитела связываются с CLDN18.2, но не с CLDN18.1. IMAB362 использовали в качестве положительного контроля связывания.

Фигура 5: Анализ связывания посредством проточной цитометрии гуманизированных антител hC11a-hC11j с клетками HEK293T, гиперэкспрессирующими CLDN18.1 или CLDN18.2. Гуманизированные антитела связываются с CLDN18.2, но не с CLDN18.1. IMAB362 и сC11-1 использовали в качестве положительного контроля связывания.

Фигура 6: Профили экспрессии FACS клеток A549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Клетки A549, неэкспрессирующие CLDN18.2 эндогенно, стабильно

трансфицировали с помощью плазмиды, кодирующей CLDN18.2, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством FACS с использованием IMAВ362.

Фигура 7: Окрашивание живых клеток посредством проточной цитометрии. На графике показана процентная доля выделенных отдельных клеток, связанных антителами против CLDN18.2 (сС11-1, hC11a, hC11b, hC11c, hC11f и IMAВ362). Отдельные клетки выделяли из опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, развившейся из инъецированных клеток А549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2 (закрашенные столбики), или здорового желудка мыши, экспрессирующего CLDN18.2 (незакрашенные столбики).

Фигура 8: Окрашивание замороженной ткани желудка. Препараты замороженной здоровой ткани желудка мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (А), hC11b (В), hC11c (С), hC11f (D) или IMAВ362 (Е). Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фигура 9: Окрашивание замороженной опухолевой ткани, развившейся из инъецированных клеток А549, гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Препараты замороженной ткани опухоли мыши, экспрессирующей CLDN18.2, окрашивали с помощью антител hC11a (А), hC11f (В), IMAВ362 (С) или антитела против пан-CLDN18 Abcam34Н14L15. Изображения являются типичными изображениями ИНС.

Фигура 10: Эффект дезамидирования в отношении активности связывания IMAВ362. После дезамидирования аффинность IMAВ362 к CLDN18.2 снижается.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение химерных и гуманизированных антител

Способы получения моноклональных антител хорошо известны. В *The Handbook of Therapeutic Antibodies, Second Edition (2014)* приведена исчерпывающая информация об этих способах, таких как получение моноклональных антител посредством иммунизации мышей или крыс (Moldenhauer, 2014), гуманизации моноклональных антител (Saldanha, 2014), биоинформатических инструментах для анализа антител (Martin and Allemn, 2014) или разработке и производстве терапевтических антител (Jacobi et al., 2014). В кратком изложении, моноклональные антитела против CLDN18.2 получали посредством ДНК-иммунизации крыс с использованием плазмиды, кодирующей кДНК CLDN18.2 человека (huCLDN18.2) (референсная последовательность NCBI: NM_001002026.3). Специфическую реактивность сывороток крыс против huCLDN18.2 анализировали посредством проточной цитометрии (анализа FC) и ELISA. Затем из лимфоцитов, выделенных из иммунизированных крыс, получали клоны гибридом для получения химерных антител. Три клон идентифицировали как являющиеся CLDN18.2-специфическими, что приводит к получению химерных антител, названных сС11-1, сС11-2 и сС11-3, со схожими CDR (см. таблицу 3). Затем сС11-1, сС11-2 и сС11-3 гуманизировали, получая 10 гуманизированных клонов, названных антителами hC11a, hC11b, hC11c, hC11d, hC11e, hC11f, hC11g, hC11h, hC11i и hC11j (см. таблицу 3).

В качестве контроля синтезировали антитело IMAB362 с использованием последовательностей тяжелой (SEQ ID NO: 55) и легкой цепи (SEQ ID NO: 56), опубликованных в WO2013/174509 и обозначенных как моноклональное антитело 182-D1106-362, регистрационный номер DSM ACC2810, депонируемое на 26 октября, 2006 в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7 B 38124 Braunschweig DE.

Таблица 3: Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности антитела

НАЗВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO
cII-1		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMHW VKQAPGKGLKWMGWINTYTGKPTYADDFKGRFVF SLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTM DAWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 27
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgacttcaagggg	SEQ ID NO: 72
HCDR3	gccgtcttctacggatatac gatggacgcg	SEQ ID NO: 73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcg tgaagatctcgtgcaaggcgagcggatatacgttcacggactacgcgatgcactg ggtaagcaagcggcgggaaagggctgaagtggatggggtgatcaaacgt acacggggaagccgacatacgcggacgacttcaagggcgattcgtgttctcgt ggagggcagcgcgagcagcggcgaacctgcaaatctgaaacctgaagaacgag gacacggcgacgtacttctgcgcggggccgtcttctacggatatac gatggacg cgtgggggcagggtaccagcgtgacggctcgcgac	SEQ ID NO: 74
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWYQ QKSGKSPQLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLK ISGMQPEDEGDYFCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 28
LCDR1	cgggcgagcgggacatctactgaaacctggcg	SEQ ID NO: 75

LCDR2	tccgtcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO: 76
LCDR3	ctgcaagggagcaacttcccgtgacg	SEQ ID NO: 77
VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgtcgtgagcgcgagcctgggggagac gatctcgatcgcgtgccgggcgagcgaggacatctactgaacctggcgtggtat caacagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatcttcccgtcaagcggctg caagacggcgtcccagaccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactc gctgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggactacttctgcctgca agggagcaacttcccgtgacgttcgggtcgggtaccaaactcgagatcaaa	SEQ ID NO: 78
cCII-2		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 7
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFTDYAMHW VKQGP GKGMKWMGWINAYTGKPTYADDFKGRFVL SLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVYYGYTM DAWGQGTSVIVSS	SEQ ID NO: 29
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaacgcgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg	SEQ ID NO: 79
HCDR3	gccgtctactacggatatac gatggac	SEQ ID NO: 80
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgt gaagatctcgtgcaagacgagcggatatacgttcacggactacgcgatgcactgg gtcaagcaggggcccagggaaaggatgaagtggatgggggtgatcaacgcgta cacggggaagccgacctacgcggacgacttcaaggggcgattcgtgctgagcct ggagggcagcgcctcgacggcgaacctgcaaatctgaaacctgaagaacgagg acacggcgacgtacttctgcgcgcccggcgtctactacggatatac gatggacgc gtgggggcaggggtaccagcgtgatcgtctcgacg	SEQ ID NO: 81
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO: 9
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO: 10
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQQ KSGKSPQLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKIS GMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 30
LCDR1	cggacgagcaggacatctactgaacctcgcg	SEQ ID NO: 82
LCDR2	tcagtcaaccggctgcaagac	SEQ ID NO: 83

LCDR3	ctgcaagggagcaagttcccgtgacg	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccagatgacgcagagccccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagac gatctcgatcgagtccgggacgagcgaggacatctactcgaacttcgctggttcc agcagaagagcggaagagccccgcagctgctgatctactcagtcaccggctgc aagacggcgtcccagaccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcg ctgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggactacttctgctgcaa gggagcaagttcccgtgacgttcgggagcgggtaccaaactcgagatcaaa	SEQ ID NO: 85
cCII-3		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINTYTGKPTYADDFKG	SEQ ID NO: 2
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMYW VKQVPKGLRWMGWINTYTGKPTYADDFKGRFVFS LEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMD AWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 31
HCDR1	gactacgcgatgtac	SEQ ID NO: 86
HCDR2	tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcgggacgacttcaagggg	SEQ ID NO: 87
HCDR3	gccgtcttctacggatatac gatggacgcg	SEQ ID NO: 73
VH	cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgt gaagatctcgtgcaagggcagcggatatacgttcacggactacgcgatgtactgg gtcaagcaagtgccgggaaagggctcgcgatggatggggtggatcaacacgtac acggggaagccgacctacgcggacgacttcaaggggcgattcgtgtctcgtgg aggcgagcgcgagcacggcgaacctgcaaactcgaacctgaagaacgaggac acggcgacgtacttctcgcgcggggccgtcttctacggatatac gatggacgcgtg ggggcagggtaccagcgtgacggctcgcgac	SEQ ID NO: 88
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 13
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPASLSASLGETISIA CRTSEDIYSNLAWYQQ KSGKSPQLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTQYSLKIS GMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO: 32
LCDR1	cggacgagcaggacatctactcgaacctggcg	SEQ ID NO: 89
LCDR2	gcgatcaagcggctgcaagac	SEQ ID NO: 90
LCDR3	ctgcaagggagcaagttcccgtgacg	SEQ ID NO: 84

VL	gacatccagatgacgcagagcccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagac gatctcgatcgctgccggagagcggagacatctactcgaacctggcgtggtatc aacagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatcttcgatcaagcggctgc aagacggcgtcccagccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcg ctgaagatctcggggatgcagccggaggacgaggggactacttctgcctgcaa gggagcaagtcccgcctgacgttcgggtcgggtaccaaactcgagatcaa	SEQ ID NO: 91
hCIIa		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 15
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 33
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 46
HCDR1	gactacgcgatgcac	SEQ ID NO: 71
HCDR2	tggatcaatacatacacggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 92
HCDR3	gcggtcttctacggatatacggatgcc	SEQ ID NO: 93
VH	caggtccaactagtccaaagcggggcggaagtaagaagcccggagcatccgtc aaagtcagctgcaagggcagcggatatacatttacggactacgcgatgcactgggt caggcaagcccctgggcaaaggctcgaatggatgggatggatcaatacatacacg gggaagccgacttatgcgcaaaaattccaaggaagagtcacaattacgggggata	SEQ ID NO: 94

	catccgcactaccgcctacatggagctaagctcgcctgaggagcaggatacggc ggtctactattgcgcccgagcggtcttctacggatatacagatggatgcctgggggc agggtaccctggtcacggctcgcgc	
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttcccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgcctgagcgcctcggcgggatagag tcaccataacatgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaac aaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagat ggagtaccgagccgatttccgggaagcgggagcgggacggatttcacgctgacc atatcaagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgcttgaaggaagcaattt cccccttgacttccgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hC11b		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI	SEQ ID NO: 47

	TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101
VH	caggccaattagtcctaaagcggggcggaagcaagaagccggggcgagcgt caaagtctcatgcaaagcgagcggatacacattacggattatgcaatgcactgggt caggcaagcaccggacaaaggctggaatggatggatggattaacacctacac gggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagaga cacgagcgcgagcaccggaatggatggatggattaacacctacacgggcaagc ccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacagagcgc cgagcaccgtaccctggtcaccgtctcgagc	SEQ ID NO: 102
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95

LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttcccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgtgagcgcacatcggtcggggatagag tcaccataacatgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaac aaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagat ggagtaccgagccgattttcgggaagcgggagcgggacggatttcacgctgacc atatcaagtttgaaccggaggattttgcgacatactattgcttgaaggaagcaattt cccccttgactttcgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hCIIc		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 34
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 47
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagcccacatactcccaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101
VH	caggtccaattagtcaaaagcggggcggaagtaagaagccggggcgagcgt caaagtctcatgcaaagcgagcggatacacatttacggattatgcaatgcaatgactgggt	SEQ ID NO: 102

	caggcaagcaccggacaaaggctggaatggatgggatggattaacacctacac gggcaagcccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagaga cacgagcgcgagcaccggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaagc ccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgc cgagcaccgtaccctggtcaccgtctcgagc	
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 39
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 52
LCDR1	cgaacgagcaggacatatactcaaacctgca	SEQ ID NO: 103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO: 104
LCDR3	ttgcaaggctccaaattcccctgaca	SEQ ID NO: 105
VL	gacatccaaatgactcaaagcccatcategetatcgatcggtcggggatagagt cacgataacatgccgaacgagcaggacatatactcaaacctgcatggtatcaac aaaagccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaagaggctgcaag acggagttccatcacgattttcgggatctggctcggggaccgattttacgctgactat atcategctgcaaccggaagattttgcaacatactactgcttgaaggctccaaattt cccctgacattcggacaaggtaggacgagatcaaa	SEQ ID NO: 106
hC11d		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINTYTGKPTYSQKFQG	SEQ ID NO: 16
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 34

Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 47
HCDR1	gattatgcaatgcac	SEQ ID NO: 99
HCDR2	tggattaacacctacacgggcaagccacatactcccaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 100
HCDR3	gctgtattctatggatatacaatggatgcc	SEQ ID NO: 101
VH	caggccaattagtcctaaagcggggcggaagcaagaagccggggcgagcgt caaagtctcatgcaaagcgagcggatacacattacggattatgcaatgactgggt caggcaagcaccggacaaaggctggaatggatgggatggattaacacctacac gggcaagccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagaga cacgagcgcgagcaccggaatggatgggatggattaacacctacacgggcaagc ccacatactcccaaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgc cgagcaccgtaccctggtcaccgtctcgagc	SEQ ID NO: 102
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO: 18
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO: 19
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQ QKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 40
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQ QKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA	SEQ ID NO: 53

	DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
LCDR1	cggacgagcgaggatatttattcgaactttgca	SEQ ID NO: 107
LCDR2	cagtcaatcggctacaagat	SEQ ID NO: 108
LCDR3	ctacaaggagcaaattcccgtgaca	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgctgagcgcattctgcggggaccgtg tcacaatcacatgccggacgagcgaggatatttattcgaactttgcatggatcaaca aaaaccgggcaaggctccgaaactttgattattcagtcgaatcggctacaagatgg cgccccgagccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacgctgacgatat catcgtacaaccggaggacttcgcgacttattactgcctacaaggagcaaattcc cgctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 109
hCIIe		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINTYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 15
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 35
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 48
HCDR1	gattacgcaatgtac	SEQ ID NO: 110
HCDR2	tggataaacctatacgggaaagccaacatacgcccaaaaattccaaggc	SEQ ID NO: 111
HCDR3	gccgtctttatggatatacagatggacgca	SEQ ID NO: 112

VH	caggtccaactggtccaatcggggctgaagtcaaaaagccggggcgagcgtc aaagtcagctgcaaagcatcgggatacacatttacggattacgcaatgtactgggtc aggcaagcaccggccaacgactggaatggatgggctggataaacctatacgg gaaagccaacatacgcccaaaaattccaaggccgctcacaataacgeggaca cgagcgcacgcacggcttatatggaactatcatcgtcgcgacggaagacacggc ggctctattatgcgcacgcgccgtctttatggatatacgatggacgcatgggggca gggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO: 113
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agcgtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgtcgcgcatcggcgggatagag tcaccataacatgcaggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaac aaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagat ggagtaccgagccgatttccgggaagcgggagcgggacggattcacgctgacc atatcaagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgcttgaaggaagcaattt ccccttgacttccgggcaaggtagcaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hCl1f		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT	SEQ ID NO: 36

	ITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 49
HCDR1	gactacgcaatgcac	SEQ ID NO: 114
HCDR2	tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 115
HCDR3	gccgtcttctatggatatac gatggatgct	SEQ ID NO: 116
VH	caggccaattggccaagcggggcggaggtaagaagccgggggcgagcgt caaagtctcatgcaaggcaagcggatatacattacggactacgcaatgactggg tccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacac ggggaagccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgattacgcggga tactagcgcgagcaccgcatataggagctaagctcgctcgatctgaggataccg ctgtatactactgcgcgagagccgtcttctatggatatac gatggatgcttgggggc agggtaccctggtcacggctcgcgac	SEQ ID NO: 117
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 41
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVA	SEQ ID NO: 54

	APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaacttgct	SEQ ID NO: 118
LCDR2	agcgtcaaaaggctccaagac	SEQ ID NO: 119
LCDR3	ctacaaggctctaacttcccattgaca	SEQ ID NO: 120
VL	gatatccaaatgacgcaatcacatctagcctatcgccctctgtgggggaccgagt cacatcacatgccgagcttcggaggacatctatagcaacttgcttgatcaaca aaagccggggaagcaccaaagctgctgatatatagcgtcaaaaggctccaagac ggagtccaagccgattctcgggctccggctccgggacggattttacgctgacaat ttcgagcctgaaccggaggactttgaacctactattgcctacaaggctctaactc ccattgacattgggcaaggtaccaaggtcagatcaaa	SEQ ID NO: 121
hCl1g		
HCDR1	DYAMH	SEQ ID NO: 1
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVFYGYTMDA	SEQ ID NO: 3
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 36
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMH WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVFYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 49
HCDR1	gactacgcaatgcac	SEQ ID NO: 114

HCDR2	tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga	SEQ ID NO: 115
HCDR3	gccgttctctatggatatacatgatggatgct	SEQ ID NO: 116
VH	caggtccaattggtccaaagcggggcggagggtcaagaagccgggggcgagcgt caaagtctcatgcaaggcaagcggatatacatttacggactacgcaatgcaactggg tccggcaagccccctgggcaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacac ggggaagccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgattacgcggga tactagcgcgagcaccgcatatagggactaagctcgcgatctgaggataccg ctgtatactactgcgcgagagccgttctctatggatatacatgatggatgcttgggggc agggtaccctggtcacggctcgcgac	SEQ ID NO: 117
LCDR1	RTSEDIYSNFA	SEQ ID NO: 18
LCDR2	SVNRLQD	SEQ ID NO: 19
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQ QKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 40
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQ QKPGKAPKLLIYSVNRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 53
LCDR1	cggacgagcgaggatatttattcgaacttgcga	SEQ ID NO: 107
LCDR2	cagtcaatcggtacaagat	SEQ ID NO: 108
LCDR3	ctacaaggagcaaatcccctgaca	SEQ ID NO: 84
VL	gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgcgtgagcgcacatctgctggggaccgtg tcacaatcacatgccggacgagcgaggatatttattcgaacttgcgatggtatcaaca aaaaccgggcaaggctccgaaacttttgatttattcagtcaatcggtacaagatgg cgtcccagccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacgctgacgatat catcgtacaaccggaggacttcgcgacttattactgcctacaaggagcaaatcc cgctgacattcggacaaggtaccaaggctcgagatcaaa	SEQ ID NO: 109
hCl1h		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8

VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTASASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTASASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 50
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatccgtca aagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccg gcaagccccggacaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacaccgg gaagccgacttatgcgcaaaaattcaaggaagggtcacgattacgcgggacacg agcgcctcaaccgatacatggagctatc gaggcctgcgaagcaggacaccgcg gtctactactgcgcgcggcggtctactatggatatac gatggacgcatgggggca gggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 41
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ	SEQ ID NO: 54

	QKPGKAPKLLIYSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
LCDR1	cgagcttcggaggacatctatagcaacttgct	SEQ ID NO: 118
LCDR2	agcgtcaaaaggctccaagac	SEQ ID NO: 119
LCDR3	ctacaaggctctaacttcccattgaca	SEQ ID NO: 120
VL	gatatccaaatgacgcaatcacatctagcctatcggcctctgtggggaccgagt caccatcacatgccgagcttcggaggacatctatagcaacttgcttggtatcaaca aaagccggggaaagcaccaaagctgctgatatatagcgtcaaaaggctccaagac ggagtcccaagccgattctcgggctccggctccgggacggattttacgtgacaat ttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactattgcctacaaggctctaacttc ccattgacattgggcaaggtaccaaggtcgatcaaaa	SEQ ID NO: 121
hCIIi		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12
HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVM	SEQ ID NO: 50

	HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HCDR1	gactacgctatgat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatac gatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggtccaactggttcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatccgtca aagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccg gcaagccccggacaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacaccgg gaagccgacttatgcgcaaaaattcaaggaagggtcacgattacgcgggacacg agcgcctcaaccgcatacatggagctatcgagcctgcgaagcgaggacaccgcg gtctactactgcgcgccccgggtctactatggatatac gatggacgcatgggggca gggtaccctggtcacggctcgcgac	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RASEDIYSNLA	SEQ ID NO: 4
LCDR2	SVKRLQD	SEQ ID NO: 5
LCDR3	LQGSNFPLT	SEQ ID NO: 6
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO: 38
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFSVKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 51
LCDR1	agggcctccgaagacatctactccaacctggca	SEQ ID NO: 95
LCDR2	agegtcaaaagactacaagat	SEQ ID NO: 96
LCDR3	ttgcaaggaagcaatttcccccttgact	SEQ ID NO: 97
VL	gacattcaaatgacgcaaaagcccatcatcgtgagcgcacggtcggggatagag tcaccataacatgcagggcctccgaagacatctactccaacctggcatggtatcaac aaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagat ggagtaccgagccgatttccgggaagcgggagcgggacggatttcacgctgacc atatcaagtttgaaccggaggatttgcgacatactattgcttgaaggaagcaattt cccccttgacttccgggcaaggtagcaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 98
hCl1j		
HCDR1	DYAMY	SEQ ID NO: 12

HCDR2	WINAYTGKPTYAQKFQG	SEQ ID NO: 20
HCDR3	AVYYGYTMDA	SEQ ID NO: 8
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 37
Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMY WVRQAPGQRLEWMGWINAYTGKPTYAQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYT MDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 50
HCDR1	gactacgctatgtat	SEQ ID NO: 122
HCDR2	tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaattcaagga	SEQ ID NO: 123
HCDR3	gcggtctactatggatatacatggacgca	SEQ ID NO: 124
VH	caggccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatccgta aagtctcgtgcaaggcatctggatacacattcaccgactacgctatgtattgggtccg gcaagccccggacaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacaccgg gaagccgacttatgcgcaaaaattcaaggaagggtcacgattacgcgggacacg agcgcctcaaccgcatacatggagctatcgagcctgcgaagcgaggacaccgcg gtctactactgcgcgcggcggtctactatggatatacatggacgcatgggggca gggtaccctggtcacggtctcgagc	SEQ ID NO: 125
LCDR1	RTSEDIYSNLA	SEQ ID NO: 17
LCDR2	AIKRLQD	SEQ ID NO: 14
LCDR3	LQGSKFPLT	SEQ ID NO: 11
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI	SEQ ID NO: 39

	SSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK	
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQ QKPGKAPKLLIFAIKRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 52
LCDR1	cgaacgagcgaggacataactcaaaccttgca	SEQ ID NO: 103
LCDR2	gcgataaagaggctgcaagac	SEQ ID NO: 104
LCDR3	ttgcaaggctccaaatttcccctgaca	SEQ ID NO: 105
VL	gacatccaaatgactcaaagccatcatcgctatcgatcggtcggggatagagt cacgataacatgccgaacgagcgaggacataactcaaaccttgcatggtatcaac aaaagccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaaggagctgcaag acggagttccatcacgattttcgggatctggctcggggaccgattttacgctgactat atcatcgctgcaaccggaagattttgcaacatactactgcttgaaggctccaaattt cccctgacattcggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa	SEQ ID NO: 106

Антитела, дополнительно описанные в примерах 2-5, модифицировали так, чтобы они содержали метку RLPQTGG (SEQ ID NO: 131) на С-конце HC и/или метку GGGGSLPQTGG (SEQ ID NO: 132) на С-конце LC. С-концевой лизин (K) на HC в этом случае заменяли Arg (R) из метки. Добавление меток не изменяло аффинность и специфичность антител к CLDN18.2.

Пример 2: Анализ ELISA и титрование FC для подтверждения связывания с CLDN18.2 химерных и гуманизированных вариантов антител

Аффинность связывания с CLDN18.2 химерных и гуманизированных антител (hCl) тестировали посредством анализа ELISA с использованием липочастиц, несущих CLDN18.2, в качестве источника антигена. CLDN18.2-липочастицы и нуль-липочастицы (без связанных антигенов, в качестве отрицательного контроля) использовали для покрытия 96-луночных планшетов в конечной концентрации 10 ед./мл. После промывки PBS/0,05% Tween-20 (PBS-T) и блокирования с помощью PBS-T/3% BSA в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C серийные разведения 1:3 тестируемых антител с начальной концентрацией 2 мкг/мл добавляли в покрытые лунки и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C. Наличие связанных антител выявляли посредством связывания HRP-конъюгированного вторичного антитела козы против человека и проявки с помощью SIGMAFAST™ OPD в качестве субстрата пероксидазы и останавливали реакцию посредством добавления 2 М H₂SO₄ с последующим считыванием OD при 490 нм на спектрофотометре для чтения планшетов для ELISA. Типичные кривые связывания показаны на фигуре 1. Все тестируемые антитела по изобретению специфически

связываются с CLDN18.2-содержащими липочастицами. Примечательно, что гуманизация химерного антитела приводила не к снижению аффинности, чего можно было бы ожидать, а даже к повышению аффинности у 6 из 10 антител по сравнению с родительским химерным антителом сC11-1.

Связывание химерных и гуманизированных антител против CLDN18.2 также тестировали посредством титрования FC с использованием клеток PA-TU-8988S (Creative Bioarray, кат. № CSC-C0326) и клеток HEK293T (ATCC, CRL-3216™), гиперэкспрессирующих CLDN18.2. Титрование FC позволяет измерять полумаксимальную эффективную концентрацию (EC_{50}) тестируемых антител. Клетки PA-TU-8988S, экспрессирующие высокие уровни CLDN18.2, выбирали посредством FACS. В настоящем описании эти клетки обозначают как клетки PA-TU-8988S-High. Учитывая окрашивание FACS с помощью IMAB362, популяция клеток PA-TU-8988S экспрессирует разные уровни CLDN18.2 с высоким и средним уровнем экспрессии (см. фигуру 2A). Для получения более гомогенной популяции клеток, клетки сортировали посредством FACS для селекции только клеток с более высокой экспрессией CLDN18.2. В кратком изложении, клетки PA-TU-8988S, суспендированные в буфере для FACS (PBS, 2% FCS), инкубировали на льду в течение 30 мин с IMAB362 в количестве 2 мкг/мл. После промывки в буфере для FACS клетки инкубировали с PE-меченым Fc γ -специфическим вторичным антителом IgG козы против человека (eBioscience) на льду в течение 30 мин. После промывки окрашенные клетки ресуспендировали в буфере для FACS, анализировали и сортировали с помощью устройства FACSAria™, отделяя клетки со средней экспрессией от клеток с высокой экспрессией (фигура 2B). После сортировки собранные клетки PA-TU-8988S-High ресуспендировали в средах для выращивания, подвергали экспансии и замороженные аликвоты сохраняли в жидком N₂. Клетки HEK293T, гиперэкспрессирующие CLDN18.2 или CLDN18.1, получали, как описано в примере 3, и экспрессию CLDN18.2 анализировали посредством проточной цитометрии (фигура 3).

Для количественного анализа связывания антител с CLDN18.2 250×10^3 клеток/лунку клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, или клеток PA-TU-8988-High высевали в буфер для FC (PBS/2% FBS) в 96-луночные планшеты и осаждали посредством центрифугирования. Антитела IMAB362 и hCl, подлежащие тестированию, разводили до 20 мкг/мл с последующими серийными разведениями 1:4 и инкубировали с высевными клетками в течение 30 мин при 4°C. PE-конъюгированное вторичное антитело против IgG человека добавляли к клеткам еще на 30 мин при 4°C после промывок буфером для FC с последующими дополнительными промывками буфером для FC. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера для FC и измеряли с помощью клеточного анализатора FACSCalibur™ (BD Biosciences, USA). Анализ FC (см. фигуру 5 и таблицу 4) показал, что антитела hCl имеют более высокое значение EC_{50} , чем IMAB362, хоть и имеют значение maxMFI в том же диапазоне, что и IMAB362. Схожие значения

maxMFI могут свидетельствовать о схожих скоростях прямой/обратной реакции в IMAV362 и антител hCl.

Таблица 4: Максимальная MFI и EC₅₀ (мкг/мл), измеренные для всех антител hCl и IMAV362, на линиях клеток HEK293T, гиперэкспрессирующих CLDN18.2, и линиях клеток PA-TU-8988S-High.

Антитело	HEK293T-CLDN18.2		PA-TU-8988S-High	
	Max MFI	EC ₅₀ (мкг/мл)	Max MFI	EC ₅₀ (мкг/мл)
IMAV362	1968	0,3878	1046	0,5082
hCl1a	1879	0,5976	1649	2,431
hCl1b	1859	0,5715	1724	1,984
hCl1c	1233	0,7531	1048	1,472
hCl1d	1642	0,5411	1530	1,933
hCl1e	1935	0,5583	1862	2,241
hCl1f	1721	0,7948	1602	2,144
hCl1g	1438	0,6779	1254	1,77
hCl1h	2076	0,4325	1949	1,75
hCl1i	2175	0,4437	2087	1,231
hCl1j	1848	0,4081	1705	1,157

Пример 3: Получение пре-B-клеток L11 и клеток HEK293T, стабильно экспрессирующих hCLDN18.1 и hCLDN18.2; тестирование специфичности связывания химерных и гуманизированных антител.

Линия пре-B-клеток L11 (Waldmeier et al., 2016) и линия клеток HEK293T (ATCC CRL-3216TM) не экспрессируют CLDN18.1 или CLDN18.2 эндогенно. Таким образом, для тестирования связывания антитела CLDN18.1 и CLDN18.2 рекомбинантно гиперэкспрессировали в этих линиях клеток. Клетки котрансфицировали посредством электропорации с использованием транспозаза-экспрессирующей конструкции (pCDNA3.1-hy-mPB), конструкции, несущей транспозируемый полноразмерный huCLDN18.1 (pPB-Puro-huCLDN18.1) или huCLDN18.2 (pPB-Puro-huCLDN18.2) вместе с кассетой резистентности к пурамицину, и конструкции, несущей EGFP в качестве контроля трансфекции (pEGFP-N3) (Waldmeier et al., 2016). После электропорации клеткам позволяли восстанавливаться в течение двух дней в средах для выращивания при 37°C во влажной камере в атмосфере 7,5% CO₂ в случае клеток L11 и атмосфере 5% CO₂ в случае клеток HEK293T. Трансфекцию подтверждали посредством анализа FC экспрессии EGFP. Затем клетки, экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2, подвергали селекции посредством добавления пурамицина в культуру в количестве 1 мкг/мл и подвергали дополнительной экспансии для получения замороженных стоков в FCS с 10% DMSO. Экспрессию CLDN18.1 и CLDN18.2 в трансфицированных клетках анализировали посредством FC (см. фигуру 3). В кратком изложении, трипсинизированные клетки

НЕК293Т и клетки L11, выращенные в суспензии, собирали посредством центрифугирования, ресуспендировали в PBS/2% FCS и окрашивали на CLDN18.2 с использованием IMAВ362 в качестве первичного антитела в количестве 2 мкг/мл на льду в течение 30 мин и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. После дополнительной промывки ресуспендированные окрашенные клетки в ледяном буфере для FC анализировали с использованием устройства FACSCalibur™ (см. фигуру 4 и фигуру 5). Нетрансфицированные родительские клетки, неэкспрессирующие CLDN18.2, использовали в качестве отрицательного контроля. Экспрессию CLDN18.1 анализировали аналогичным образом, с использованием собственного антитела против пан-CLDN18, распознающего CLDN18.1 и CLDN18.2 (см. фигуру 3). Также будет подходить любое антитело против пан-CLDN18, которое можно использовать для измерения посредством проточной цитометрии, такое как антитело против клаудина-18/CLDN18 (С-конец), поставляемое OriGene Technologies (кат. № AP50944PU-N), pAb кролика против CLDN18 (С-конец) от MyBioSource (кат. № MBS8555451) или антитело против CLDN18 от ProSci (кат. № 63-847).

Таким образом, клетки L11 и НЕК293Т, стабильно экспрессирующие huCLDN18.1 и huCLDN18.2, использовали для тестирования специфичности связывания химерных антител сC11-1, сC11-2, сC11-3 и гуманизированных антител с CLDN18.2, но не CLDN18.1. Клетки окрашивали на льду в течение 30 мин с использованием антител в количестве 2 мкг/мл и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. Все три химерных антитела (фигура 4) и гуманизированные антитела (фигура 5) связываются с huCLDN18.2, экспрессируемым клетками L11 или НЕК293Т, но не с huCLDN18.1. Кроме того, гуманизированные антитела связываются с huCLDN18.2 с аффинностью, схожей с IMAВ362, и с по меньшей мере такой же хорошей аффинностью, что и сC11-1 (фигура 5).

Пример 4: Тестирование связывающей активности гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством проточной цитометрии на живой опухолевой ткани и живой ткани желудка

Линия клеток A549 (ATCC CCL-185™) не экспрессирует CLDN18.1 или CLDN18.2 эндогенно. Для тестирования связывания антитела с CLDN18.2, CLDN18.2 экспрессировали в клетках A549. Клетки A549 котрансфицировали посредством электропорации с помощью транспозаза-экспрессирующей конструкции (pсDNA3.1-hu-mPB) (Klose et al., 2017), конструкции, несущей транспозируемый полноразмерный huCldn18.2 (pPB-Puro-huCldn18.1) вместе с экспрессирующей кассетой пурамицина, и конструкции, несущей EGFP в качестве контроля трансфекции (pEGFP-N3) (Waldmeier et al., 2016). После электропорации клеткам позволяли восстанавливаться в течение двух дней в средах для выращивания при 37°C во влажной камере в атмосфере 5% CO₂.

Трансфекцию проверяли посредством анализа FC экспрессии EGFP. Затем клетки, экспрессирующие CLDN18.1 или CLDN18.2, подвергали селекции посредством добавления пуромицина в культуру в количестве 1 мкг/мл и подвергали дополнительной экспансии для получения замороженных стоков в FCS с 10% DMSO. Экспрессию CLDN18.2 в трансфицированных клетках анализировали посредством FC. В кратком изложении, трипсинизированные клетки A549 собирали посредством центрифугирования, ресуспендировали в PBS/2% FCS и окрашивали на CLDN18.2 с использованием IMAV362 в качестве первичного антитела в количестве 2 мкг/мл на льду в течение 30 мин и, после промывки в PBS/2% FCS, окрашивали с помощью PE-конъюгированного антитела козы против IgG человека (Fc гамма-специфического) в количестве 2,5 мкг/мл (eBioscience) в качестве вторичного антитела в течение 30 мин на льду. После дополнительной промывки ресуспендированные окрашенные клетки в ледяном буфере для FC анализировали с использованием устройства FACSCalibur™ (см. фигуру 6). Нетрансфицированные родительские клетки, неэкспрессирующие CLDN18.2, использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки депонированы на 6 декабря 2019 года в DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig DE и доступны под регистрационным номером DSM ACC3360.

Двум мышам Balb/c подкожно имплантировали 1×10^6 клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, в 100 мкл 50% матригеля и рост опухолей подвергали мониторингу в течение нескольких недель до достижения опухолью желаемого размера 150-450 мм³. Здоровую ткань желудка и опухолевую ткань собирали для анализа FC. Собранные ткани нарезали на небольшие фрагменты и расщепляли с помощью набора для диссоциации опухоли Miltenyi (MACS MiltenyiBiotec, Germany). Фрагменты опухолей инкубировали с буфером для диссоциации (полученным по инструкциям производителя) в 6-луночных планшетах в течение 30 мин при 37°C и постоянном осторожном встряхивании. Образцы ресуспендировали и пропускали через клеточное сито 70 мкм (Corning, USA) с последующей промывкой 20 мл буфера для FC (PBS+2% FBS). Центрифугировали суспензии клеток (5 мин при 400×g и 4°C) и выбрасывали супернатанты. При необходимости, суспензии клеток пропускали через сито, повторно центрифугировали и ресуспендировали осадки в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов (Biolegend, USA), инкубировали на льду в течение 4 мин. После инкубации добавляли 25 мл PBS и суспензии снова центрифугировали (5 мин при 400×g и 4°C). Осадки ресуспендировали в буфере FC (0,5-3 мл с учетом осадка). Равное количество клеток переносили в 96-луночные планшеты и дополнительно обрабатывали для анализа FC. Клетки в планшетах промывали PBS и центрифугировали (при 400×g в течение 2 мин при 4°C). Осадки ресуспендировали в 50 мкл/лунку смеси для окрашивания, состоящей из выбранного антитела (cC11-1, hC11a, hC11b, hC11c и hC11f в количестве 4 мкг/мл; IMAV362 в количестве 2 мкг/мл) и AF488-меченого антитела против пан-цитокератина AE1/AE3 (Thermo Fisher Scientific, USA), разведенного в PBS, и инкубировали в течение 25 мин на льду. После инкубации клетки промывали дважды в PBS и центрифугировали (при 400×g

в течение 2 мин при 4°C). Осадки ресуспендировали в 50 мкл/лунку смеси для вторичного окрашивания (PBS+PE-меченое антитело против человека) (Thermo Fisher Scientific, USA) и инкубировали в течение 25 мин на льду. После инкубации клетки снова промывали дважды в PBS. Осадки ресуспендировали в 100 мкл PBS, содержащем DAPI. Планшеты держали на льду до анализа FC. Для анализа FC живые клетки отделяли от погибших клеток с помощью прямого светорассеяния и окрашивания DAPI. Затем живые клетки гейтировали по наличию цитокератина (AF888-положительные) и связанных антител против CLDN18.2 (PE-положительные клетки). Результаты анализ FC можно видеть на фигуре 7 и в таблице 5. Результаты представляют собой средние данные, полученные для двух мышей.

Все тестируемые антитела (cCl1-1, hCl1a, hCl1b, hCl1c, hCl1f и IMAB364) связывались со схожей процентной долей опухолевых клеток, несущих CLDN18.2, приблизительно от 20% до 30%. Однако, неожиданно, только IMAB362 связывалось со здоровыми клетками желудка, несущими CLDN18.2, в то время как связывание cCl1-1, hCl1a, hCl1b, hCl1c и hCl1f было едва детектируемым - связывание менее 1% здоровых клеток желудка. Различие связывающей способности между CLDN18.2-экспрессирующими опухолевыми клетками, происходящими из инъецированных клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, и здоровыми клетками желудка также выражали как соотношение % положительных опухолевых клеток и % положительных клеток желудка (см. последний столбец в таблице 5). Это соотношение составляло менее 5 и в среднем близко к 1 для IMAB362 и выше 15, в среднем выше 30 для тестируемых гуманизированных клонов cCl1-1 (hCl1a, hCl1b, hCl1c и hCl1f).

Таблица 5: Данные FC о связывании и соотношении связывания выбранных антител со здоровыми клетками желудка и опухолевыми клетками.

	% положительных опухолевых клеток			% положительных здоровых клеток желудка			Соотношение опухоль/желудка		
	Мышь 1	Мышь 2	Среднее	Мышь 1	Мышь 2	Среднее	Соотношение для мыши 1	Соотношение для мыши 2	Соотношение для среднего значения
cCl1-1	37	15	26	0,4	0,3	0,35	92,5	50	74,3
hCl1a	34	18	26	1,2	0,3	0,75	28,3	60	34,7
hCl1b	43	17	30	1	0,13	0,565	43	130,7	53,1
hCl1c	29	8	18,5	0,1	0,4	0,25	290	20	74
hCl1f	32	14	23	0,04	0,1	0,07	800	140	328,6
IMAB	33	11	22	13	37	25	2,53	0,29	0,88

362									
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Таким образом, сC11-1 и тестируемые гуманизированные клоны сC11-1 (hC11a, hC11b, hC11c и hC11f) демонстрировали повышенное связывание с опухолевыми клетками относительно здоровых клеток желудка и, таким образом, являются опухолеспецифическими антителами против CLDN18.2. В отличие от этого, IMAB362 не позволяет различать опухолевые клетки, несущие CLDN18.2, и здоровые клетки желудка, несущие CLDN18.2.

Пример 5: Тестирование гуманизированных антител против CLDN18.2 посредством иммуногистохимии (ИНС) на замороженных образцах ткани

Свежие образцы желудка и опухолевой ткани, экспрессирующие CLDN18.2 и полученные из мышей Balb/c, которым подкожно имплантировали 1×10^6 клеток A549, экспрессирующих CLDN18.2, быстро замораживали в OCT в подходящей форме для ткани. Тканевые срезы толщиной 5-15 мкм нарезали с помощью криостата при -20°C , переносили на предметное стекло при комнатной температуре (RT), а затем держали замороженным до окрашивания ИНС. Перед окрашиванием стекла переносили обратно в RT и фиксировали предварительно охлажденным ацетоном (-20°C) в течение 10 мин. После испарения ацетона при RT стекла промывали TBS и обрабатывали для блокирования неспецифических участков окрашивания: препараты инкубировали в 0,3% H_2O_2 в течение 15 мин при RT с последующими промывками TBS и инкубацией в пероксидаза-блокирующем растворе (Agilent, USA) в течение 60 мин при RT. После блокирования препараты обрабатывали для окрашивания антителами: препараты инкубировали с первичными антителами (hCL1a, hC11b, hC11c, hC11f, IMAB362 и антителом против пан-CLDN18 34H14L15 (Abcam, USA)) в течение 120 мин при RT, промывали TBS с последующей инкубацией с HRP-конъюгированным антителом против человека (или против антитела кролика в случае антитела против пан-CLDN18) в течение 30 мин при RT. Связывание антитела с CLDN18.2 или пан-CLDN18 на тканевых срезах выявляли посредством обработки препаратов хромогенной системой субстрата DAB+ (Agilent, USA) по инструкциям производителя. После последующих промывок TBS препараты докрашивали гематоксилином, промывали dH_2O в течение 15 мин, дегидратировали в последовательных промывках 95% и 100% этанолом с последующей очисткой препаратов в ксилене. И наконец, препараты закрывали покровным стеклом в глицериновой заливочной среде (Agilent, USA). Типичные микроскопические изображения окрашивания здоровой ткани желудка мыши и опухолевой ткани мыши можно найти на фигуре 8 и фигуре 9, соответственно.

На фигуре 8 показано типичное окрашивание здоровой ткани желудка. В ткани, совместно окрашенной только hCL1a, hC11b, hC11c и hC11f (соответственно, панели A, B, C и D), видимым является только окрашивание ядер гематоксилином, в то время как ткань, совместно окрашенная IMAB362 (панель E), демонстрирует мембранной окрашивание CLDN18.2 DAB. Таким образом, тестируемые гуманизированные клоны сC11-1 (hCL1a, hC11b, hC11c и hC11f) не связываются со здоровой тканью желудка,

экспрессирующей CLDN18.2, в отличие от IMAB362, связывающегося со здоровой тканью желудка, экспрессирующей CLDN18.2. Кроме того, на фигуре 9 показано типичное окрашивание опухолевой ткани, панель А, В, С и D являются типичным изображением опухолевой ткани, окрашенной hC11a, hC11f, IMAB362 и антителом против пан-CLDN18 Abcam34H14L15, соответственно. Все опухоли, окрашенные тестируемыми антителами, демонстрируют сильное мембранное окрашивание CLDN18.2 DAB. Тестируемые гуманизированные клоны сC11-1 (hC11a и hC11f) связывались с опухолевой тканью мыши, экспрессирующей CLDN18.2, аналогично IMAB362 или антителу против пан-CLDN18. Таким образом, гуманизированные клоны сC11-1 демонстрируют повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, по сравнению со здоровой тканью желудка, экспрессирующей CLDN18.2.

Пример 6: Анализ склонности к Asn-дезамидированию и Asp-изомеризацию вариантов гуманизированного антитела (hC1) и IMAB362

Дезамидирование остатков Asn (N) и изомеризация остатков Asp (D) может происходить во время производства, хранения или клинического использования биофармацевтических средств (in vivo). Дезамидирование и изомеризация могут приводить к потенциальным изменениям структуры, функции, активности, стабильности и иммуногенности белка. Таким образом, их необходимо минимизировать и контролировать, особенно в нормативном контексте. Наличие мотивов дезамидирования Asn и изомеризации Asp можно анализировать in silico. Наиболее распространенным мотивом дезамидирования Asn является мотив NG, и а наиболее распространенным мотивом Asp-изомеризации является мотив DG.

Такой анализ in silico показал, что все антитела hC1 имели потенциальный мотив Asp-изомеризации DG во 2-ой CDR VL, и ни одно из антител hC1 или IMAB362 не имело потенциальных мотивов дезамидирования NG в своих CDR. Для проверки прогнозирования in silico антитела hC1 и IMAB362 подвергали стрессовому воздействию при высоком pH или низком pH и нагреванию для ускорения модификации, которая может возникнуть при производстве и длительном хранении. В кратком изложении, образцы антител подвергали замене буфера с использованием центрифужных фильтров Amicon на 20 mM буфер фосфата натрия, pH 8,0, для стрессового тестирования Asn-дезамидирования или 20 mM цитратного буфера, pH 5,5, для стрессового тестирования Asp-изомеризации, и образцы разводили до конечной концентрации 3,0 мг/мл. 30 мкл образца инкубировали в течение 1 недели (Asn-дезамидирование) или 2 недель (Asp-изомеризация) при 40°C в термоблоке с нагреваемой противоконденсационной крышкой. Подвергнутые стрессу и неподвергнутые стрессу образцы хранили при -80°C. Asn-дезамидирование и Asp-изомеризация образцов анализировали посредством хроматографии с сильным катионным обменом (SCX). Дезамидирование Asn приводит к получению хроматограммы SCX с повышением площади пика перед основным пиком (bM), в то время как Asp-изомеризация приводит к получению хроматограммы SCX с повышением площади пика после основного пика (aM) (Du et al., 2012). Хроматографию

SCX осуществляли на колонке MAbPac SCX-10 (ThermoFisher Scientific, Basel, CH) с буфером А при pH 4,0 и буфером В при pH 11,0. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин с градиентом pH 30-80% буфера В. 10 мкг образца в 20 мкл буфера А вводили в колонку. Детекцию образца осуществляли по поглощению белка при 280 нм. Антитела hCl демонстрировали только повышение bM приблизительно 27,9-32,2% (см. таблицу 6), что не классифицировали как критическое. Однако IMAV362 демонстрировало выраженное повышение bM 40,9% (см. таблицу 6), несмотря на то, что это антитело не имеет мотив NG в вариабельных доменах. В отличие от моноклональных антител против CLDN18.2 по изобретению, IMAV362 имеет два мотива NS в положениях CDR3 HC (аминокислоты 103-104) (SEQ ID NO: 55) и CDR1 LC (аминокислоты 31-32) (SEQ ID NO: 56). Мотивы NS являются вторыми по частоте мотивами для дезамидирования.

Таблица 6: Стрессовый тест дезамидирования mAb, хроматография с сильным катионным обменом (SCX)

mAb	Стресс Да (+)/нет(-)	Доля bM (%)	Повышение доли bM после стрессового теста (%)
hCl1a	-	20,9	27,9
	+	48,8	
hCl1b	-	19,7	29,1
	+	48,8	
hCl1c	-	19,4	31,2
	+	50,6	
hCl1d	-	18,2	32,2
	+	50,4	
hCl1e	-	21,4	28,1
	+	49,5	
hCl1f	-	18,7	28,9
	+	47,6	
hCl1g	-	18,8	28,6
	+	47,4	
hCl1h	-	17,5	31,6
	+	49,1	
hCl1i	-	20,5	30,0
	+	50,5	
hCl1j	-	20,2	30,0
	+	50,2	
IMAV362	-	26,0	40,9

	+	66,9	
--	---	------	--

Влияние стрессового теста Asn-дезамидирования на аффинность связывания с CLDN18.2 hC11a, hC11i и IMAB362 тестировали посредством анализа ELISA с использованием липочастиц, несущих CLDN18.2, в качестве источника антигена. CLDN18.2-липочастицы и нуль-липочастицы (без антигенов) использовали для покрытия 96-луночных планшетов при конечной концентрации 10 ед./мл в 100 мМ карбоната натрия, pH 9,6. После промывки PBS/0,05% Tween-20 (PBS-T) и блокирования с помощью PBS-T/3% BSA в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C, добавляли серийные разведения 1:3 антител hC1 с начальной концентрацией 2 мкг/мл и инкубировали в течение по меньшей мере 1 ч. при 37°C. Наличие связанных антител выявляли по связыванию HRP-конъюгированного вторичного антитела козы против человека, проявляли с помощью Sigma-Fast OPD в качестве субстрата пероксидазы, реакцию останавливали посредством добавления 2 М H₂SO₄ и считывание осуществляли при OD-490 с помощью спектрофотометра для чтения планшетов для ELISA. Значение EC₅₀ IMAB362 было в 1,8 раз выше после стрессового теста дезамидирования (неподвергнутый стрессу референс: EC₅₀ 51,5 нг/мл, подвергнутый стрессу: EC₅₀ 95,09 нг/мл) (см. фигуру 10). Это может быть связано с повышением bM 40,9% при SCX после стрессового теста дезамидирования (см. таблицу 6). Подтверждая результаты SCX в отношении Asn-дезамидирования, не наблюдали значимых различий связывания антигена после стрессового теста дезамидирования hC11a и hC11i (см. таблицу 6). Таким образом, стрессовый тест дезамидирования показал, что антитела hC1 менее склонны к дезамидированию и потенциально сниженному связыванию мишени, чем IMAB362, и являются прогнозируемо более стабильными во время производства, хранения и клинического использования (in vivo), что приводит к получению более однородного и активного антитела/продукта.

Хотя все антитела hC1 имели потенциальный мотив Asp-изомеризация DG во 2-ой CDR VL и в домене CH2 и CH3 HC (VL- CDR2 (в положении 62), CH2 (в положении 282), CH3 (в положении 403)), с помощью стрессового теста Asp-изомеризации не выявили Asp-изомеризацию (см. таблицу 7) в отличие от прогнозируемого из Du et al (Du et al., 2012). Значения aM неподвергнутых стрессу образцов (за исключением IMAB362) являлись уже значимо высокими. Это может являться результатом вариантов тяжелой цепи с лизиновым клиппированием. IMAB362 являлось единственным антителом без высокой aM в неподвергнутом стрессу образце. IMAB362 являлось единственным тестируемым антителом против CLDN18.2 без C-концевого Lys, что позволяет предполагать, что в случае антител hC1 клиппирование C-концевого Lys является наиболее вероятной причиной повышенной aM в неподвергнутом стрессу и подвергнутых стрессу образцах.

Таблица 7: Стрессовый тест Asp-изомеризации mAb, хроматография с сильным катионным обменом (SCX)

mAb	Стресс	Доля aM (%)	Повышение доли aM после
-----	--------	-------------	-------------------------

	Да (+)/нет(-)		стрессового теста (%)
hC11a	-	45,1	-6,5
	+	38,6	
hC11b	-	45,2	-5,7
	+	39,5	
hC11c	-	40,3	-2,3
	+	38,1	
hC11d	-	41,3	-4,6
	+	36,7	
hC11e	-	44,4	-4,2
	+	40,2	
hC11f	-	43,5	-1,8
	+	41,7	
hC11g	-	44,5	-6,4
	+	38,0	
hC11h	-	43,2	-4,7
	+	38,5	
hC11i	-	44,1	-4,6
	+	39,5	
hC11j	-	43,7	-7,7
	+	36,0	
IMAB362	-	1,5	4,1
	+	5,6	

Настоящее изобретение также описано с помощью следующих вариантов осуществления:

1. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2.

2. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно.

3. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

а. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

d. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

e. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

f. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

g. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

h. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

i. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

4. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно; или

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

5. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащий:

a. последовательность VH SEQ ID NO: 27 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;

b. последовательность VH SEQ ID NO: 29 и последовательность VL SEQ ID NO: 30; или

c. последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

- e. последовательность VH SEQ ID NO: 37;
 - и
 - f. последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - g. последовательность VL SEQ ID NO: 39;
 - h. последовательность VL SEQ ID NO: 40; или
 - i. последовательность VL SEQ ID NO: 41.
8. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:
- a. последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - b. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - 38;
 - c. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 39;
 - d. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;
 - 40;
 - e. последовательность VH SEQ ID NO: 35 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - f. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - g. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;
 - 40;
 - h. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
 - 41;
 - i. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
 - или
 - j. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 39.
9. Антитело по любому из вариантов осуществления 1-3, содержащее:
- a. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 46, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51;
 - b. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 47, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51;
 - c. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности

i. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 50, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 51;

j. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 50, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 52,

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

10. Антитело по варианту осуществления 1 или 2, содержащее:

a. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

b. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

c. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52;

d. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;

e. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 48 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

f. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 47 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;

g. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 49 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 53;

h. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;

i. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

j. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52,

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

11. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10, где антитело или его фрагмент представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH,

scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии.

12. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-11, где антитело или его фрагмент является гуманизированным.

13. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-12, где антитело или его фрагмент не связывается с CLDN18.1.

14. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-13, где антитело или его фрагмент является менее восприимчивым к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAV362.

15. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, где антитело или его фрагмент метит в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз или по меньшей мере 20 раз больше опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2, относительно клеток здоровой ткани, экспрессирующих CLDN18.2, при измерении посредством проточной цитометрии.

16. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, где повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2, измеряют посредством проточной цитометрии или посредством иммуногистохимии.

17. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-16, где антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, экспрессирующимся на клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, со значением EC₅₀ в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, по меньшей мере 1,5 раз, по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 2,5 раза выше, но не более чем 3 раза выше значения EC₅₀ связывания IMAV362 с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High.

18. Антитело или его фрагмент по варианту осуществления 17, где связывание измеряют с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC).

19. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-18, где антитело или его фрагмент является выделенным.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19.

21. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 20.

22. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 20 или вектор по варианту осуществления 21.

23. Антитело или его фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-19, нуклеиновая кислота по варианту осуществления 20, вектор по варианту осуществления 21 или клетка-хозяин по варианту осуществления 22 для применения в лечении индивидуума

a. страдающего,

b. имеющего риск развития, и/или

c. у которого диагностировано

неопластическое заболевание.

24. Антитело или его фрагмент для применения по варианту осуществления 23, где неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких.

25. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент

(i) связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

(ii) конкурирует за связывание с антителом, содержащим последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51; и/или

(iii) конкурентно ингибирует связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51, с CLDN18.2.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 DYAMH

SEQ ID NO: 2 WINTYTGKPTYADDFKG

SEQ ID NO: 3 AVFYGYTMDA

SEQ ID NO: 4 RASEDIYSNLA

SEQ ID NO: 5 SVKRLQD

SEQ ID NO: 6 LQGSNFPLT

SEQ ID NO: 7 WINAYTGKPTYADDFKG

SEQ ID NO: 8 AVYYGYTMDA

SEQ ID NO: 9 RTSEDIYSNFA

SEQ ID NO: 10 SVNRLQD

SEQ ID NO: 11 LQGSKFPLT

SEQ ID NO: 12 DYAMY

SEQ ID NO: 13 RTSEDIYSNLA

SEQ ID NO: 14 AIKRLQD

SEQ ID NO: 15 WINTYTGKPTYAQKFQG

SEQ ID NO: 16 WINTYTGKPTYSQKFQG

SEQ ID NO: 17 RTSEDIYSNLA

SEQ ID NO: 18 RTSEDIYSNFA

SEQ ID NO: 19 SVNRLQD

SEQ ID NO: 20 WINAYTGKPTYAQKFQG

SEQ ID NO: 21 DYAMX

X в 5-ом положении является H или Y

SEQ ID NO: 22 WINXYTGKPTYXXXFXG

X в 4-ом положении является T или A;

X в 12-ом положении является A или S;

X в 13-ом положении является D или Q;

X в 14-ом положении является D или K;

X в 16-ом положении является K или Q

SEQ ID NO: 23 AVXYGYTMDA

X в 3-ем положении является F или Y

SEQ ID NO: 24 RXSEDIYSNXA

X во 2-ом положении является A или T;

X в 10-ом положении является L или F

SEQ ID NO: 25 XXXRLQD

X в 1-ом положении является S или A;

X во 2-ом положении является V или I;

X в 3-ем положении является K или N

SEQ ID NO: 26 LQGSXFPLT

X в 5-ом положении является K или N

SEQ ID NO: 27, переменная область HC cC11-1

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMHWVKQAPGKGLKWMGWINT
YTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQ
GTSVTVSS

SEQ ID NO: 28, переменная область LC cC11-1

DIQMTQSPASLSASLGETISIACRASEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFSVKRLQD
GVPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSNFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 29, переменная область HC cC11-2

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKTSGYTFTDYAMHWVKQGPQKGMKWMGWIN
AYTGKPTYADDFKGRFVLSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVYYYGYTMDAW
GQGTSVIVSS

SEQ ID NO: 30, переменная область LC cC11-2

DIQMTQSPASLSASLGETISIECRTSEDIYSNFAWFQQKSGKSPQLLIYSVNRLQDG
VPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 31, переменная область HC cC11-3

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAMYWVKQVPGKGLRWMGWINT
YTGKPTYADDFKGRFVFSLEASASTANLQISNLKNEDTATYFCARAVFYGYTMDAWGQ
GTSVTVSS

SEQ ID NO: 32, переменная область LC cC11-3

DIQMTQSPASLSASLGETISIACRTSEDIYSNLAWYQQKSGKSPQLLIFAIKRLQDG
VPSRFSGSGSGTQYSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPLTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 33, переменная область HC hC11a

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA
WGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 34, переменная область HC hC11b, c и d

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
 NTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDAW
 GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35, вариabельная область HC hCL1e

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 36, вариabельная область HC hCL1f и g

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVFYGYTMDA
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 37, вариabельная область HC hCL1h, i и j

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARAVYYGYTMDA
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 38, вариabельная область LC hCL1a, b, e и i

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 39, вариabельная область LC hCL1c и j

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQD
 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 40, вариabельная область LC hCL1d и g

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQQKPGKAPKLLIYSVNRQLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 41, вариabельная область LC hCL1f и h

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 42, вариabельная область HC hCL3a, b и c

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVSGYSVSSNYRWHWIRQPPGKGLEWIGYINIA
 GSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNPSITRAMDAWGQGT
 LTVSS

SEQ ID NO: 43, вариabельная область LC hCL3a

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ
 TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 44, вариabельная область LC hCL3b

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ
 TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 45, вариabельная область LC hCL3c

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIFKNLEWYQQKPGKAPKLLIYYTNNLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCYQYNSGPFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 46, полноразмерная HC hCL1a

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDA
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 47, полноразмерная HC hCL1b, c и d

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
 NTYTGKPTYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDAW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48, полноразмерная HC hCL1e

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI
 NTYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDA
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49, полноразмерная HC hCL1f и g

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQRLEWMGWI
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVFYGYTMDA
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50, полноразмерная HC hCL1h, i и j

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAMYWVRQAPGQRLEWMGWI
 NAYTGKPTYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAVYYGYTMDA
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51, полноразмерная LC hCL1a, b, e и i

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFSVKRLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
 SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 52, полноразмерная LC hCL1c и j

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIFAIKRLQD
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSS
 TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 53, полноразмерная LC hCL1d и g

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYSNFAWYQQKPGKAPKLLIYSVNRQLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQGSKFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
 SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 54, полноразмерная LC hCL1f и h

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYSVKRLQ
 DGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCLQGSNFPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSL
 SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 55, полноразмерная HC IMAB362

QVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGGLWIGNIYPS
 DSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWGGG
 TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56, полноразмерная LC IMAB362

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPELLI
 YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
 SKDYSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 57 DQWSTQDLYN

SEQ ID NO: 58 NNPVTAVFNYQ

SEQ ID NO: 59 STQDLYNNPVTAVF

SEQ ID NO: 60 TNFWMSTANMYTG

SEQ ID NO: 61 ALMIVGIVLGAIGLLV

SEQ ID NO: 62 RIGSMEDSAKANMTLTSGIMFIVS

SEQ ID NO: 63

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLGTGTELGSTPVWWNSADGRM
DQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRAAIQH
SGGRSRRARTKTHLRRGSE

SEQ ID NO: 64 MDQWSTQDLYNNPVT

SEQ ID NO: 65 LYNNPVTAVFNYQGL

SEQ ID NO: 66 VFNYQGLWRSCVRES

SEQ ID NO: 67 QGLWRSCVRESSGFT

SEQ ID NO: 68 RSCVRESSGFTECRG

SEQ ID NO: 69 TEDEVQSYPSKHDIYV

SEQ ID NO: 70 EVQSYPSKHDIYV

SEQ ID NO: 71 gactacgcatgac

SEQ ID NO: 72

tggatcaacacgtacacggggaagccgacatacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO: 73 gccgtctctacggatatacgtggacgacg

SEQ ID NO: 74

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtgcaagggcagcggata
tacgttcacggactacgcgatgactgggtcaagcaagcgggggaaagggctgaagtggatggggtggatcaacacgtacacgggg
aagccgacatacgcggacgactcaagggcgatctgtttctcgtggaggcagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctcgaacct
gaagaacgaggacacggcgacttctcgcgcgggcccgtctctacggatatacgtggacgcgtgggggaggggtaccagcgtg
acggctcgcagc

SEQ ID NO: 75 cgggcgagcaggacatctactcgaacctggcg

SEQ ID NO: 76 tccgtcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO: 77 ctgcaaggagcaactcccgtgacg

SEQ ID NO: 78

gacatccagatgacgcagagcccggcgtcgtgagcgcgagcctgggggagacgatctcgtatcgcgtgccgggcgagcga
ggacatctactcgaacctggcgtggatcaacagaagagcgggaagagcccgcagctgctgatcttctccgtcaagcggctgcaagacg
gcgtcccagccgattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact
acttctcgtcgaagggagcaactcccgtgacgttcgggtcgggtaccaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO: 79

tggatcaacgcgtacacggggaagccgacactacgcggacgactcaagggg

SEQ ID NO: 80 gccgtctactacggatatacgtggac

SEQ ID NO: 81

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtgcaagacgagcggata
tacgttcacggactacgcgatgactgggtcaagcagggggccagggaaagggatgaagtggatggggtggatcaacgcgtacacgggg

aagccgacctacgcggacgacttcaagggcgattcgtgctgagcctggaggcgagcgcctcgacggcgaacctgcaaatctcgaacct
gaagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggccgtctactacggatatacgatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtg
atcgtctcgagc

SEQ ID NO: 82 cggacgagcgaggacatctactcgaacttcgcg

SEQ ID NO: 83 tcagtcaaccggctgcaagac

SEQ ID NO: 84 ctgcaaggagcaagttcccgtgacg

SEQ ID NO: 85

gacatccagatgacgcagagccccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgatcgagtccggacgagcga
ggacatctactcgaacttcgctgggtccagcagaagagcgggaagagccccagctgctgatctactcagtcaaccggctgcaagacgg
cgtcccagcccattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggacta
cttctgctgcaaggagcaagttcccgtgacgttcgggagcgggtaccaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO: 86 gactacgcgatgtac

SEQ ID NO: 87

tggatcaacacgtacacggggaagccgacctacgcggacgacttcaagggg

SEQ ID NO: 88

cagatccagctcgtccagagcgggcccggagctgaagaagccgggggagagcgtgaagatctcgtgcaaggcgagcggata
tacgttcacggactacgcgatgtactgggtcaagcaagtcccgggaaaggctgcgatggatgggggtgatcaacacgtacacgggga
agccgacctacgcggacgacttcaagggcgattcgtgttctcgtggaggcgagcgcgagcacggcgaacctgcaaatctcgaacctg
aagaacgaggacacggcgacttctgcgcggggccgttcttacggatatacgatggacgcgtgggggcagggtaccagcgtga
cggctctcgagc

SEQ ID NO: 89 cggacgagcgaggacatctactcgaacctggcg

SEQ ID NO: 90 gcgatcaagcggctgcaagac

SEQ ID NO: 91

gacatccagatgacgcagagccccggcgagcctgagcgcgagcctgggggagacgatctcgatcgctgcccggacgagcga
ggacatctactcgaacctggcgtggtatcaacagaagagcgggaagagccccagctgctgatcttcgatcaagcggctgcaagacg
gcgtcccagcccattctcggggagcgggagcgggacgcagtactcgtgaagatctcggggatgcagccggaggacgagggggact
acttctgctgcaaggagcaagttcccgtgacgttcgggtcgggtaccaaactcgagatcaaa

SEQ ID NO: 92

tggatcaatacatcacggggaagccgacttatgcgcaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 93 gcggttcttacggatatacggatgcc

SEQ ID NO: 94

caggtccaactagtccaaagcggggcggaagtcaagaagccccggagcatccgtcaaagtcagctgcaaggcgagcggat
acatttacggactacgcgatgactgggtcaggcaagccccctgggcaaaaggctcgaatggatgggatggatcaatacatcacgggga
gccgacttatgcgcaaaaattccaaggaagagtcacaattacgcgggatacatccgatctaccgctacatggagctaagctcgtcggg
agcgaggatacggcggctactattgcgcccagcgggttcttacggatatacggatgcctgggggcagggtaccctggtcacggct
cgagc

SEQ ID NO: 95 agggcctccgaagacatctactccaacctggca

SEQ ID NO: 96 agcgtcaaaagactacaagat

SEQ ID NO: 97 ttgcaaggaagcaatttccccttgact

SEQ ID NO: 98

gacattcaaatgacgcaaagcccatcatcgctgagcgcacggcggggatagagtcaccataacatgcaggcctccgaaga
 catctactccaacctggcatggtatcaacaaaaccggggaaggctccgaagctgctgatatttagcgtcaaaagactacaagatggagta
 ccgagccgattttcgggaagcgggagcgggacggatttcacgctgaccatatcaagtttgaaccggaggattttgcgacatactattgctt
 gcaaggaagcaatttccccttgactttcgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO: 99 gattatgcaatgcac

SEQ ID NO: 100

tggattaacacctacacgggcaagcccacatactccccaaaattccaagga

SEQ ID NO: 101 gctgtattctatggatatacaatggatgcc

SEQ ID NO: 102

caggtccaattagtcxaaagcggggcggaagtcaagaagccggggcgagcgtcaaagtctcatgcaaagcgagcgggatac
 acatttacggattatgcaatgactgggtcaggcaagcaccgggcaaaaggctggaatggatgggattgattaacacctacacgggcaag
 cccacatactccccaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgcgagcaccggaatggatgggattgattaacacct
 acacgggcaagcccacatactccccaaaattccaaggaagggtcacgataacgagagacacgagcgcgagcaccgtaccctggtcacc
 gtctcgagc

SEQ ID NO: 103 cgaacgagcgggacatactcaaaccttgca

SEQ ID NO: 104 gcgataaagaggctgcaagac

SEQ ID NO: 105 ttgcaaggctccaaatttcccctgaca

SEQ ID NO: 106

gacatccaaatgactcaaagcccatcatcgctatcggcatcggcggggatagagtcacgataacatgccgaacgagcggagga
 catatactcaaaccttgcatggtatcaacaaaaccggggaaggccccgaagctactgatattcgcgataaagaggctgcaagacggagtt
 ccatcacgattttcgggatcggctcggggaccgattttacgctgactatatcatcgctgcaaccggaagattttgcaacatactactgcttga
 aggtccaaatttcccctgacattcgggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO: 107 cggacgagcgggattttattcgaactttgca

SEQ ID NO: 108 cagtcaatcggctacaagat

SEQ ID NO: 109

gacatccaaatgacgcaatcaccgagctcgctgagcgcacgtcggggaccgtgcacaatcacatgccggacgagcggagg
 atatttattcgaactttgcatggtatcaacaaaaccgggcaaggctccgaaacttttgatttattcagtcgaatcggctacaagatggcgtccc
 agccgatttagcgggagcggatcgggaaccgactttacgctgacgatcatcgctacaaccggaggacttcgcgacttattactgctaca
 agggagcaaatcccctgacattcgggacaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO: 110 gattacgcaatgtac

SEQ ID NO: 111

tggataaatacctatacgggaaagccaacatacgccecaaaaattccaaggc

SEQ ID NO: 112 gccgtctttatggatatacgatggacgca

SEQ ID NO: 113

caggtccaactggccaatcgggggctgaagtcaaaaagccggggcgagcgtcaaagtcagctgcaaagcatcgggatac
 acatttacggattacgcaatgtactgggtcaggcaagcaccggccaacgactggaatggatgggctggataaatacctatacgggaaag
 ccaacatacgccecaaaaattccaagccgcgtcacaataacggggacacgagcgcacggcttatatggaactatcatcgctgcga
 tcggaagacacggcggctattattgcgcacgcgccgtctttatggatatacgatggacgcacggggcaggggtaccctggtcacggctc
 gagc

SEQ ID NO: 114 gactacgcaatgcac

SEQ ID NO: 115

tggattaatgcctacacggggaagccgacctacgcacaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 116 gccgtcttctatggatatac gatggatgct

SEQ ID NO: 117

caggccaattggccaagcggggcgagggtcaagaagccggggcgagcgtcaaagtctcatgcaaggcaagcggatat
acatttacggactacgcaatgactgggtccggcaagcccctgggcaacggctggaatggatgggatggattaatgcctacacggggaag
ccgacctacgcacaaaaattccaaggacgagtcacgattacgcgggatactagcgcgagcaccgcatatatggagctaagctcgctcga
tctgaggataccgctgtatactactgcgcgagagccgtcttctatggatatac gatggatgcttggggcgagggtaccctggtcacggctcgcg
agc

SEQ ID NO: 118 cgagcttcggaggacatctatagcaacttgct

SEQ ID NO: 119 agcgtcaaaaggctccaagac

SEQ ID NO: 120 ctacaaggctctaactcccattgaca

SEQ ID NO: 121

gatatccaaatgacgcaatcaccatctagcctatcggcctctgtggggaccgagtcaccatcacatgccgagcttcggaggac
atctatagcaacttgcttggatcaacaaaagccggggaaagcaccaaagctgctgatatacgcgtcaaaaggctccaagacggagctc
caagecgattctcgggtccggctccgggacggatcttacgctgacaatttcgagcctgcaaccggaggactttgcaacctactattgcttac
aaggtctaactcccattgacatttgggcaaggtaccaaggtcgagatcaaa

SEQ ID NO: 122 gactacgctatgat

SEQ ID NO: 123

tggattaatgcctacaccgggaagccgacttatgcgcaaaaaattccaagga

SEQ ID NO: 124 gcggttactatggatatac gatggacgca

SEQ ID NO: 125

caggccaactggtcaatctggagcgggaagtcaagaagccccggagcatccgtcaaagtctcgtgcaaggcatctggatacac
attcaccgactacgctatgtattgggtccggcaagccccggacaacggctggaatggatgggatggattaatgectacaccgggaagcc
gacttatgcgcaaaaaattccaaggaagggtcacgattacgcgggacacgagcgcctcaaccgatacatggagctatcgagcctcgaag
cgaggacaccgcggttactactgcgcggggcggttactatggatatac gatggacgcatggggcgagggtaccctggtcacggctcgcg
gagc

SEQ ID NO: 126 WINXYTGKPTYXQKFQG

X в 4-ом положении является T или A;

X в 12-ом положении является A или S

[CDR2 HC только для hC11x, а не химерных клонов cC11-1,2,3]

SEQ ID NO: 127

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[константный домен легкой цепи - CL]

SEQ ID NO: 128

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [константный домен тяжелой
 цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 129

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK [мутация L234A/L235A в
 константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 130

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK[мутация
 L236A/L236A/P329G в константном домене тяжелой цепи - CH1+Fc-домен]

SEQ ID NO: 131 RLPQTGG [метка сортазы]

SEQ ID NO: 132 GGGGS-LPQTGG [метка сортазы]

SEQ ID NO: 133 CLDN18.2

MAVTACQGLGFVVSLLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSC
 VRESSGFTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAK
 ANMTLTSGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTF
 GAALFVGWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKAS
 TGFGSNTKNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV

Ссылки

Abbott, W. M., M. M. Damschroder, and D. C. Lowe. 2014. 'Current approaches to fine mapping of antigen-antibody interactions', *Immunology*, 142: 526-35.

Abdiche, Y. N., D. S. Malashock, A. Pinkerton, and J. Pons. 2009. 'Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors', *Anal Biochem*, 386: 172-80.

Alegre, M. L., A. M. Collins, V. L. Pulito, R. A. Brosius, W. C. Olson, R. A. Zivin, R. Knowles, J. R. Thistlethwaite, L. K. Jolliffe, and J. A. Bluestone. 1992. 'Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a "humanized" OKT3 monoclonal antibody', *J Immunol*, 148: 3461-8.

An, Z., G. Forrest, R. Moore, M. Cukan, P. Haytko, L. Huang, S. Vitelli, J. Z. Zhao, P. Lu, J. Hua, C. R. Gibson, B. R. Harvey, D. Montgomery, D. Zaller, F. Wang, and W. Strohl. 2009. 'IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function', *MAbs*, 1: 572-9.

Bolt, S., E. Routledge, I. Lloyd, L. Chatenoud, H. Pope, S. D. Gorman, M. Clark, and H. Waldmann. 1993. 'The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties', *Eur J Immunol*, 23: 403-11.

Chang, Z. L., and Y. Y. Chen. 2017. 'CARs: Synthetic Immunoreceptors for Cancer Therapy and Beyond', *Trends Mol Med*, 23: 430-50.

Chu, S. Y., I. Vostiar, S. Karki, G. L. Moore, G. A. Lazar, E. Pong, P. F. Joyce, D. E. Szymkowski, and J. R. Desjarlais. 2008. 'Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies', *Mol Immunol*, 45: 3926-33.

Dall'Acqua, W. F., R. M. Woods, E. S. Ward, S. R. Palaszynski, N. K. Patel, Y. A. Brewah, H. Wu, P. A. Kiener, and S. Langermann. 2002. 'Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences', *J Immunol*, 169: 5171-80.

Diebolder, C. A., F. J. Beurskens, R. N. de Jong, R. I. Koning, K. Strumane, M. A. Lindorfer, M. Voorhorst, D. Ugurlar, S. Rosati, A. J. Heck, J. G. van de Winkel, I. A. Wilson, A. J. Koster, R. P. Taylor, E. O. Saphire, D. R. Burton, J. Schuurman, P. Gros, and P. W. Parren. 2014. 'Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface', *Science*, 343: 1260-3.

Du, Y., A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, and H. Liu. 2012. 'Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies', *MAbs*, 4: 578-85.

Ellerman, D. 2019. 'Bispecific T-cell engagers: Towards understanding variables influencing the in vitro potency and tumor selectivity and their modulation to enhance their efficacy and safety', *Methods*, 154: 102-17.

Gervais, D. 2016. 'Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact', *J Chem Technol Biotechnol*, 91: 569-75.

Green, M. R., and J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Hansel, T. T., H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell, and A. J. George. 2010. 'The safety and side effects of monoclonal antibodies', *Nat Rev Drug Discov*, 9: 325-38.

Hashimoto, Y., W. Zhou, K. Hamauchi, K. Shirakura, T. Doi, K. Yagi, T. Sawasaki, Y. Okada, M. Kondoh, and H. Takeda. 2018. 'Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5', *Sci Rep*, 8: 8383.

Hewitt, K. J., R. Agarwal, and P. J. Morin. 2006. 'The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues', *BMC Cancer*, 6: 186.

Idusogie, E. E., P. Y. Wong, L. G. Presta, H. Gazzano-Santoro, K. Totpal, M. Ultsch, and M. G. Mulkerrin. 2001. 'Engineered antibodies with increased activity to recruit complement', *J Immunol*, 166: 2571-5.

Jacobi, A., B. Enenkel, P. Garidel, C. Eckermann, M. Knappenberger, I. Presser, and H. Kaufmann. 2014. 'Process Development and Manufacturing of Therapeutic Antibodies.' in S.

Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Jiang, H., Z. Shi, P. Wang, C. Wang, L. Yang, G. Du, H. Zhang, B. Shi, J. Jia, Q. Li, H. Wang, and Z. Li. 2018. 'Claudin18.2-Specific Chimeric Antigen Receptor Engineered T Cells for the Treatment of Gastric Cancer', *J Natl Cancer Inst*.

June, C. H., and M. Sadelain. 2018. 'Chimeric Antigen Receptor Therapy', *N Engl J Med*, 379: 64-73.

Klose, D., M. Woitok, J. Niesen, R. R. Beerli, U. Grawunder, R. Fischer, S. Barth, R. Fendel, and T. Nachreiner. 2017. 'Generation of an artificial human B cell line test system using Transpo-mAbTM technology to evaluate the therapeutic efficacy of novel antigen-specific fusion proteins', *PLoS One*, 12: e0180305.

Lazar, G. A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J. S. Peng, L. Hyun, C. Chan, H. S. Chung, A. Eivazi, S. C. Yoder, J. Vielmetter, D. F. Carmichael, R. J. Hayes, and B. I. Dahiya. 2006. 'Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 4005-10.

Leabman, M. K., Y. G. Meng, R. F. Kelley, L. E. DeForge, K. J. Cowan, and S. Iyer. 2013. 'Effects of altered FcγR binding on antibody pharmacokinetics in cynomolgus monkeys', *MAbs*, 5: 896-903.

Lo, M., H. S. Kim, R. K. Tong, T. W. Bainbridge, J. M. Vernes, Y. Zhang, Y. L. Lin, S. Chung, M. S. Dennis, Y. J. Zuchero, R. J. Watts, J. A. Couch, Y. G. Meng, J. K. Atwal, R. J. Brezski, C. Spiess, and J. A. Ernst. 2017. 'Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice', *J Biol Chem*, 292: 3900-08.

Lu, X., R. P. Nobrega, H. Lynaugh, T. Jain, K. Barlow, T. Boland, A. Sivasubramanian, M. Vasquez, and Y. Xu. 2019. 'Deamidation and isomerization liability analysis of 131 clinical-stage antibodies', *MAbs*, 11: 45-57.

Martin, A. C. R., and J. Allemn. 2014. 'Bioinformatics Tools for Analysis of Antibodies.' in, *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Mimoto, F., T. Igawa, T. Kuramochi, H. Katada, S. Kadono, T. Kamikawa, M. Shida-Kawazoe, and K. Hattori. 2013. 'Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant', *MAbs*, 5: 229-36.

Moldenhauer, G. 2014. 'Selection Strategies for Monoclonal Antibodies.' in S. Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Moore, G. L., H. Chen, S. Karki, and G. A. Lazar. 2010. 'Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions', *MAbs*, 2: 181-9.

Natsume, A., M. In, H. Takamura, T. Nakagawa, Y. Shimizu, K. Kitajima, M. Wakitani, S. Ohta, M. Satoh, K. Shitara, and R. Niwa. 2008. 'Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities', *Cancer Res*, 68: 3863-72.

Niimi, T., K. Nagashima, J. M. Ward, P. Minoo, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, and S. Kimura. 2001. 'Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing', *Mol Cell Biol*, 21: 7380-90.

Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. 'Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells', *Mol Cancer Ther*, 7: 2517-27.

Rother, R. P., S. A. Rollins, C. F. Mojcik, R. A. Brodsky, and L. Bell. 2007. 'Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria', *Nat Biotechnol*, 25: 1256-64.

Sahin, U., M. Koslowski, K. Dhaene, D. Usener, G. Brandenburg, G. Seitz, C. Huber, and O. Tureci. 2008. 'Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development', *Clin Cancer Res*, 14: 7624-34.

Sahin, U., M. Schuler, H. Richly, S. Bauer, A. Krilova, T. Dechow, M. Jerling, M. Utsch, C. Rohde, K. Dhaene, C. Huber, and O. Tureci. 2018. 'A phase I dose-escalation study of IMAB362 (Zolbetuximab) in patients with advanced gastric and gastro-oesophageal junction cancer', *Eur J Cancer*, 100: 17-26.

Saldanha, J. W. 2014. 'Humanization Strategies.' in S. Duebel and J. M. Reichert (eds.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Second Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.).

Shang, L., B. Daubeuf, M. Triantafilou, R. Olden, F. Depis, A. C. Raby, S. Herren, A. Dos Santos, P. Malinge, I. Dunn-Siegrist, S. Benmkaddem, A. Geinoz, G. Magistrelli, F. Rousseau, V. Buatois, S. Salgado-Pires, W. Reith, R. Monteiro, J. Pugin, O. Leger, W. Ferlin, M. Kosco-Vilbois, K. Triantafilou, and G. Elson. 2014. 'Selective antibody intervention of Toll-like receptor 4 activation through Fc gamma receptor tethering', *J Biol Chem*, 289: 15309-18.

Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, D. Xie, J. Lai, A. Stadlen, B. Li, J. A. Fox, and L. G. Presta. 2001. 'High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R', *J Biol Chem*, 276: 6591-604.

Stavenhagen, J. B., S. Gorlatov, N. Tuaille, C. T. Rankin, H. Li, S. Burke, L. Huang, S. Vijh, S. Johnson, E. Bonvini, and S. Koenig. 2007. 'Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcγ receptors', *Cancer Res*, 67: 8882-90.

Tao, M. H., and S. L. Morrison. 1989. 'Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region', *J Immunol*, 143: 2595-601.

Tureci, O., U. Sahin, H. Schulze-Bergkamen, Z. Zvirbule, F. Lordick, D. Koeberle, P. Thuss-Patience, T. Ettrich, D. Arnold, F. Bassermann, S. E. Al-Batran, K. Wiechen, K. Dhaene, D. Maurus, M. Gold, C. Huber, A. Krivoschik, A. Arozullah, J. W. Park, and M. Schuler. 2019. 'A multicentre, phase 2a study of zolbetuximab as a single agent in patients with recurrent or refractory advanced adenocarcinoma of the stomach or lower oesophagus: the MONO study', *Ann Oncol*.

Vafa, O., G. L. Gilliland, R. J. Brezski, B. Strake, T. Wilkinson, E. R. Lacy, B. Scallon, A. Teplyakov, T. J. Malia, and W. R. Strohl. 2014. 'An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations', *Methods*, 65: 114-26.

Waldmeier, L., I. Hellmann, C. K. Gutknecht, F. I. Wolter, S. C. Cook, S. T. Reddy, U. Grawunder, and R. R. Beerli. 2016. 'Transpo-mAb display: Transposition-mediated B cell display and functional screening of full-length IgG antibody libraries', *MAbs*, 8: 726-40.

Walker, M. R., J. Lund, K. M. Thompson, and R. Jefferis. 1989. 'Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors', *Biochem J*, 259: 347-53.

Wang, X., M. Mathieu, and R. J. Brezski. 2018. 'IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions', *Protein Cell*, 9: 63-73.

Xu, D., M. L. Alegre, S. S. Varga, A. L. Rothermel, A. M. Collins, V. L. Pulito, L. S. Hanna, K. P. Dolan, P. W. Parren, J. A. Bluestone, L. K. Jolliffe, and R. A. Zivin. 2000. 'In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies', *Cell Immunol*, 200: 16-26.

Yu, D., and J. R. Turner. 2008. 'Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 709-16.

Zalevsky, J., A. K. Chamberlain, H. M. Horton, S. Karki, I. W. Leung, T. J. Sproule, G. A. Lazar, D. C. Roopenian, and J. R. Desjarlais. 2010. 'Enhanced antibody half-life improves in vivo activity', *Nat Biotechnol*, 28: 157-9.

CN109762067

WO2000/015659

WO2004/047863

WO2005/113587

WO2007/059997

WO2008/145338

WO2013/167259

WO2013/174509

WO2014/075788

WO2014/127906

WO2016/166122

WO2016/165762

WO2018/006882

WO2019/173420

WO2019/175617

WO2019/219089

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент демонстрирует повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2.

2. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, содержащее последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно.

3. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, содержащее:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

d. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

e. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

f. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

g. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 11, соответственно;

h. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно; или

i. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно.

4. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, содержащее:

a. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, соответственно;

b. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно; или

c. последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 11, соответственно,

предпочтительно содержащее:

d. последовательность VH SEQ ID NO: 27 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;

e. последовательность VH SEQ ID NO: 29 и последовательность VL SEQ ID NO: 30; или

f. последовательность VH SEQ ID NO: 31 и последовательность VL SEQ ID NO: 32.

5. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-3, содержащее:

a. последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

b. последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

c. последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35;

d. последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36; или

e. последовательность VH, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или, по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37;

и

f. последовательность VL, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38;

g. последовательность VL, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39;

h. последовательность VL, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40; или

i. последовательность VL, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41,

предпочтительно содержащее:

- a. последовательность VH SEQ ID NO: 33;
- b. последовательность VH SEQ ID NO: 34;
- c. последовательность VH SEQ ID NO: 35;
- d. последовательность VH SEQ ID NO: 36; или
- e. последовательность VH SEQ ID NO: 37;

и

- f. последовательность VL SEQ ID NO: 38;
- g. последовательность VL SEQ ID NO: 39;
- h. последовательность VL SEQ ID NO: 40; или
- i. последовательность VL SEQ ID NO: 41.

6. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, содержащее:

a. последовательность VH SEQ ID NO: 33 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
b. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;

c. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 39;
d. последовательность VH SEQ ID NO: 34 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;

e. последовательность VH SEQ ID NO: 35 и последовательность VL SEQ ID NO: 38;
f. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;
g. последовательность VH SEQ ID NO: 36 и последовательность VL SEQ ID NO: 40;

h. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 41;

i. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 38; или

j. последовательность VH SEQ ID NO: 37 и последовательность VL SEQ ID NO: 39.

7. Антитело по любому из пп.1-3, содержащее:

a. последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 46, и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по

г. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 54;

с. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

т. последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 50 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 52,

или их версии со сконструированным Fc-доменом.

8. Антитело или его фрагмент, связывающееся с CLDN18.2, где антитело или его фрагмент

(i) связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51;

(ii) конкурирует за связывание с антителом, содержащим последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51; и/или

(iii) конкурентно ингибирует связывание антитела, содержащего последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 46 и последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 51, с CLDN18.2.

9. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-8, где антитело или его фрагмент

а. представляет собой IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, синтетический IgG, IgM, F(ab)₂, Fv, scFv, IgGACH2, F(ab')₂, scFvCH3, Fab, VL, VH, scFv4, scFv3, scFv2, dsFv, Fv, scFv-Fc, (scFv)₂, неистошающий IgG, диатело, бивалентное антитело или их Fc-сконструированные версии;

б. является гуманизированным;

с. не связывается с CLDN18.1;

д. является выделенным; и/или

е. является менее склонным к посттрансляционному дезамидированию, чем IMAV362.

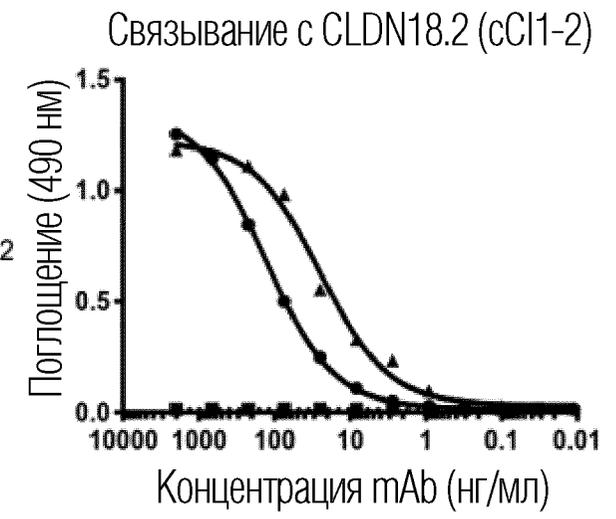
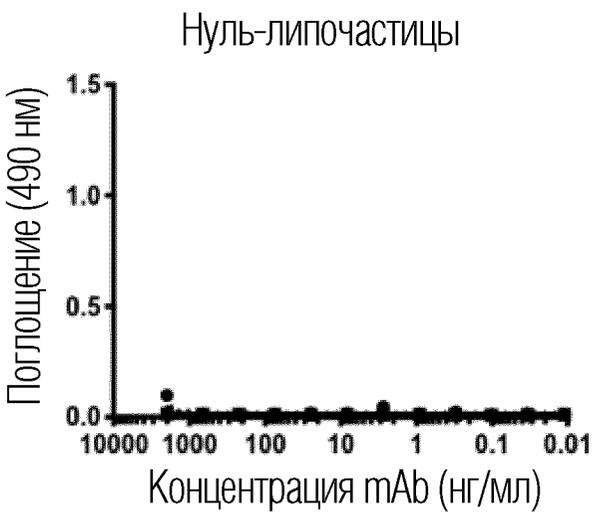
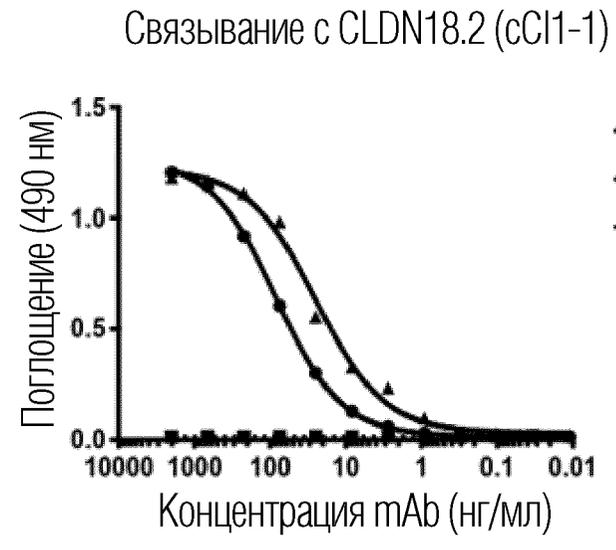
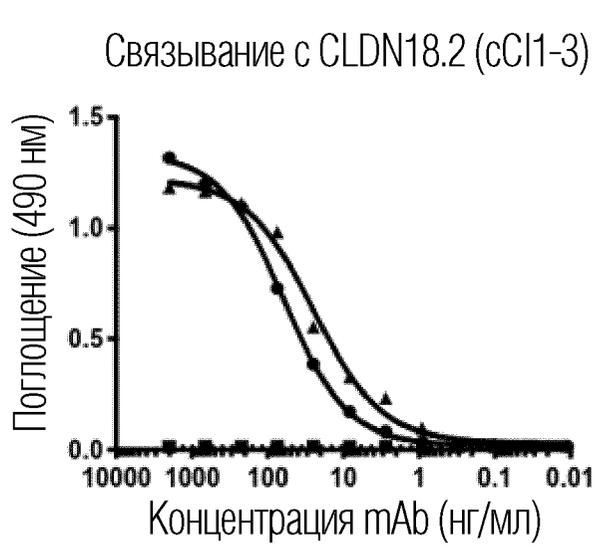
10. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-9, где повышенное связывание с опухолевой тканью, экспрессирующей CLDN18.2, относительно здоровой ткани, экспрессирующей CLDN18.2, измеряют посредством проточной цитометрии или посредством иммуногистохимии.

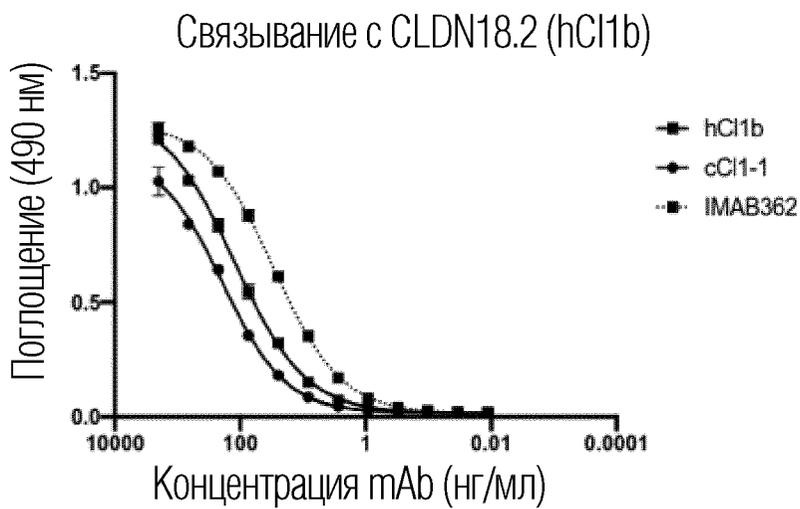
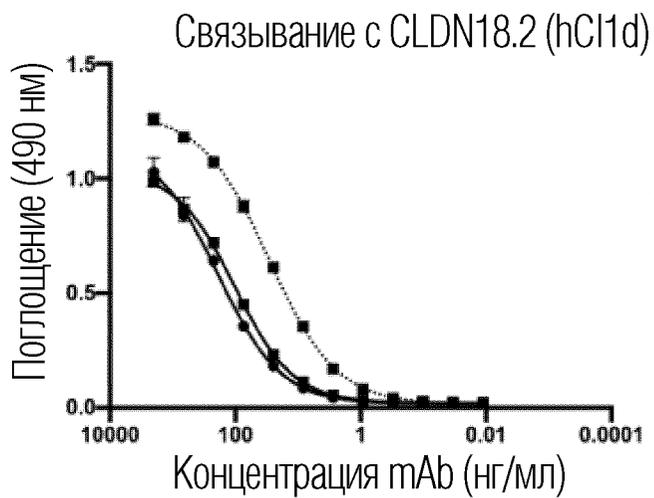
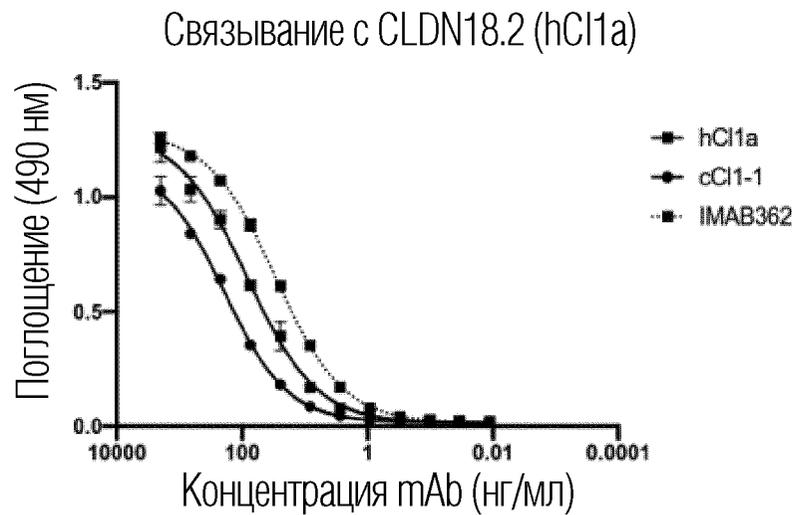
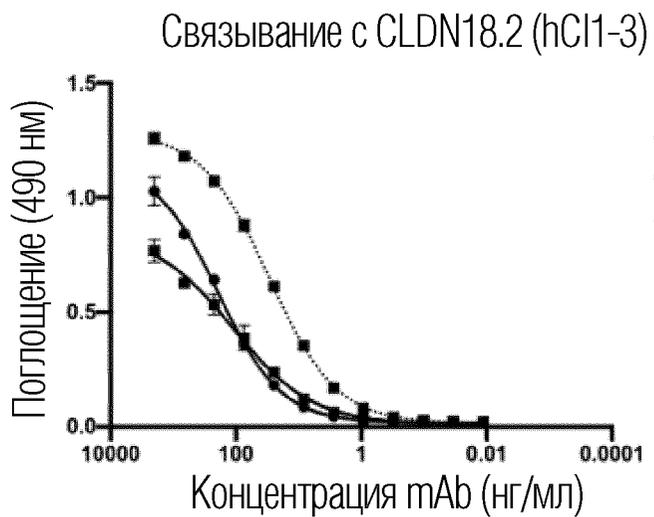
11. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или его фрагмент связывается с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, со значением EC₅₀ в по меньшей мере 1,1 раз, по меньшей мере 1,2 раз, по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 2 раза или по меньшей мере 2,5 раза выше, но не более чем 3 раза выше значения EC₅₀ связывания IMAV362 с CLDN18.2, экспрессирующимся в клетках HEK293T или клетках PA-TU-8988-High, необязательно, где связывание измеряют с помощью титрования посредством проточной цитометрии (FC).

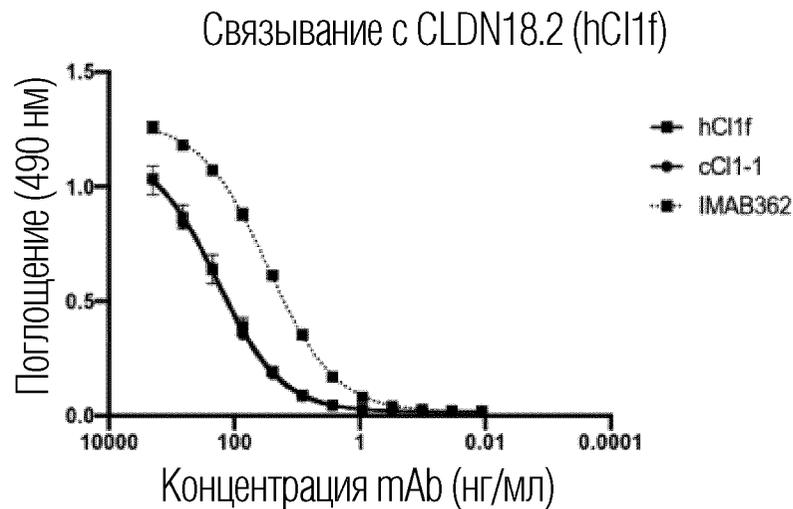
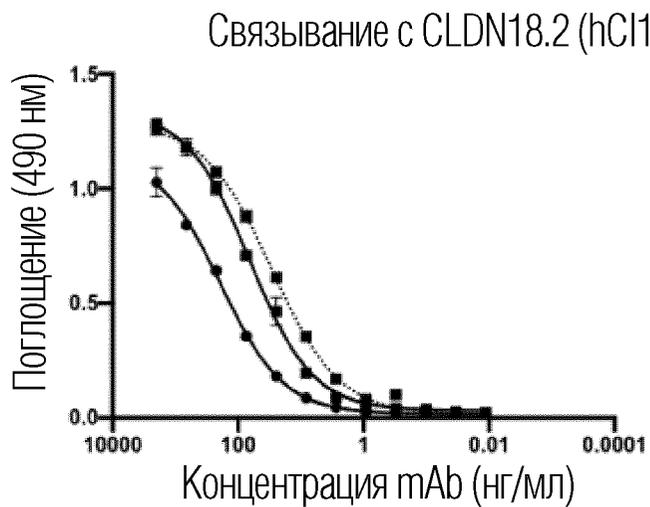
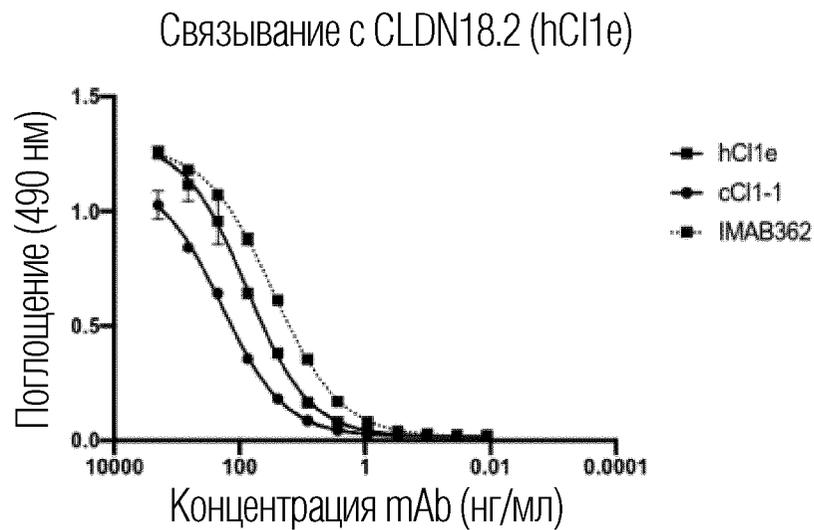
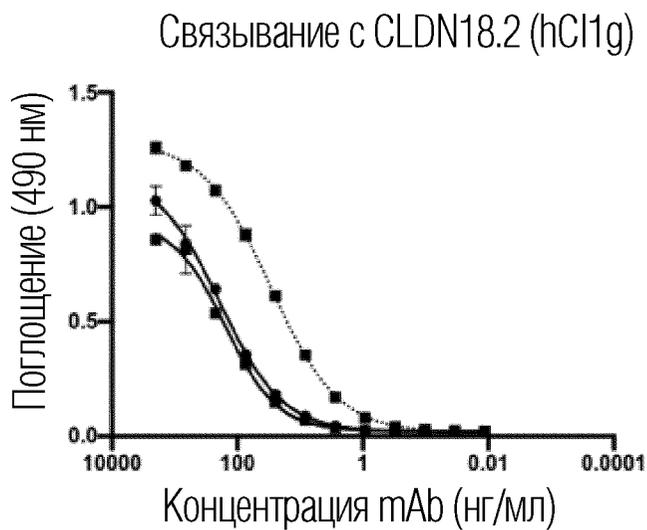
12. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11.

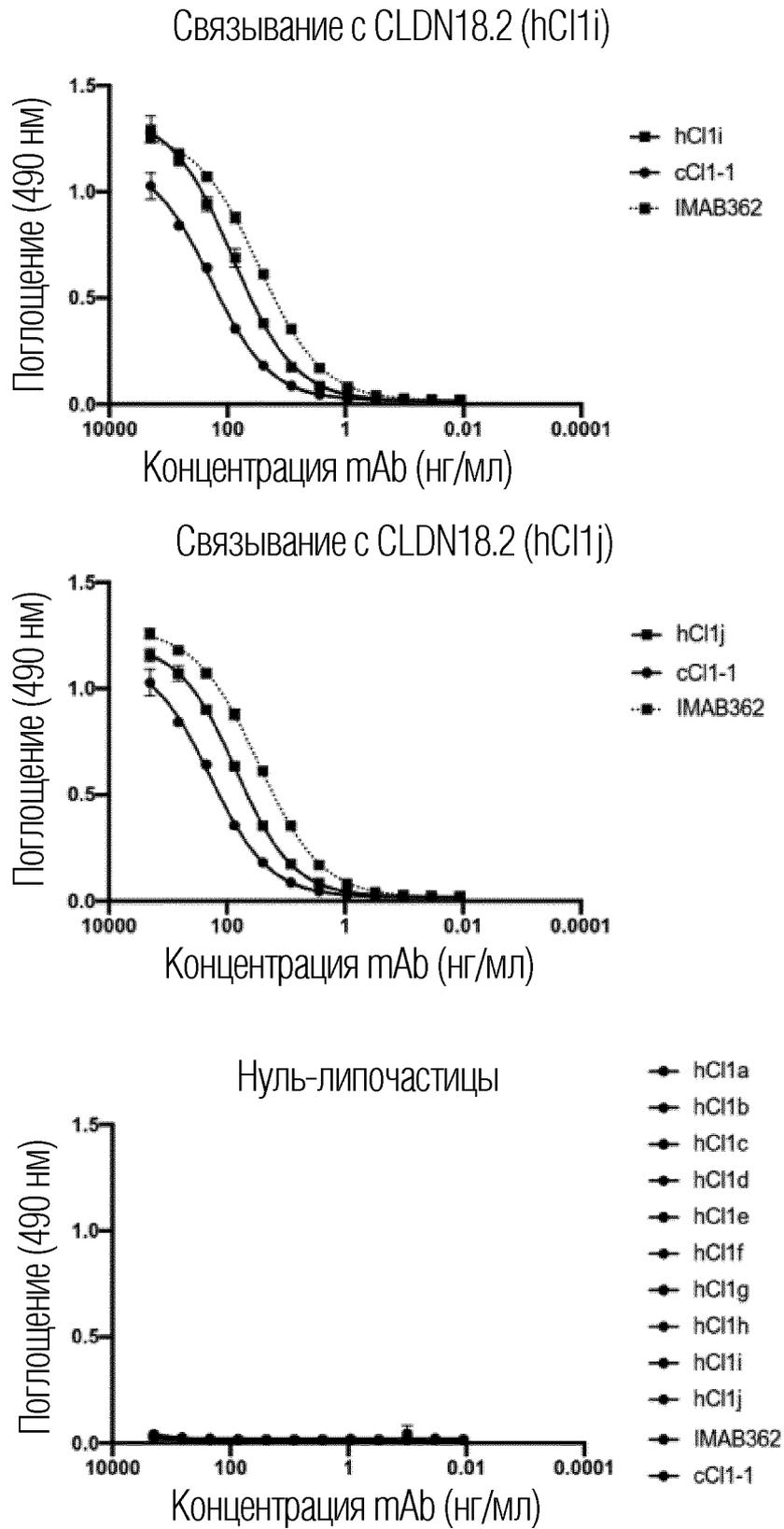
13. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.12.
14. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.12 или вектор по п.13.
15. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-11, нуклеиновая кислота по п.12, вектор по п.13 или клетка-хозяин по п.14 для применения в лечении индивидуума
 - а. страдающего,
 - б. имеющего риск развития, и/или
 - в. у которого диагностировано неопластическое заболевание; необязательно, где неопластическое заболевание выбрано из группы, состоящей из рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичника и рака легких.

По доверенности

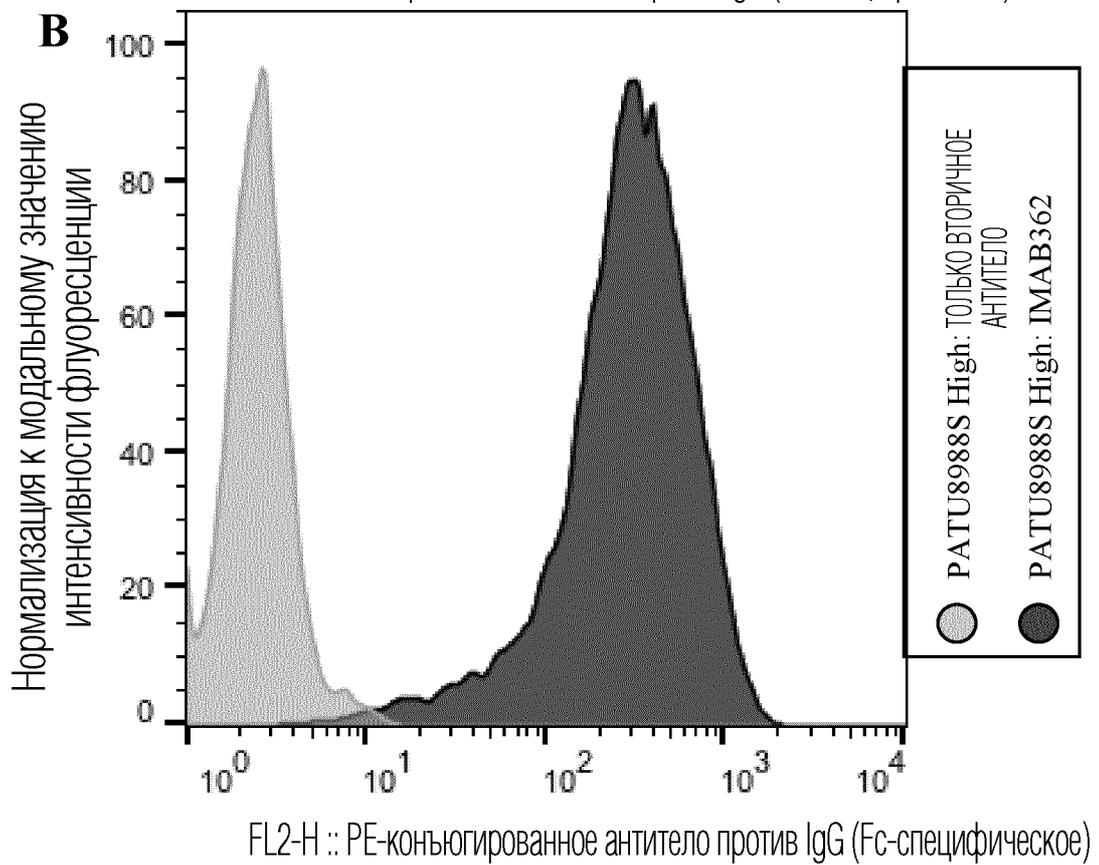
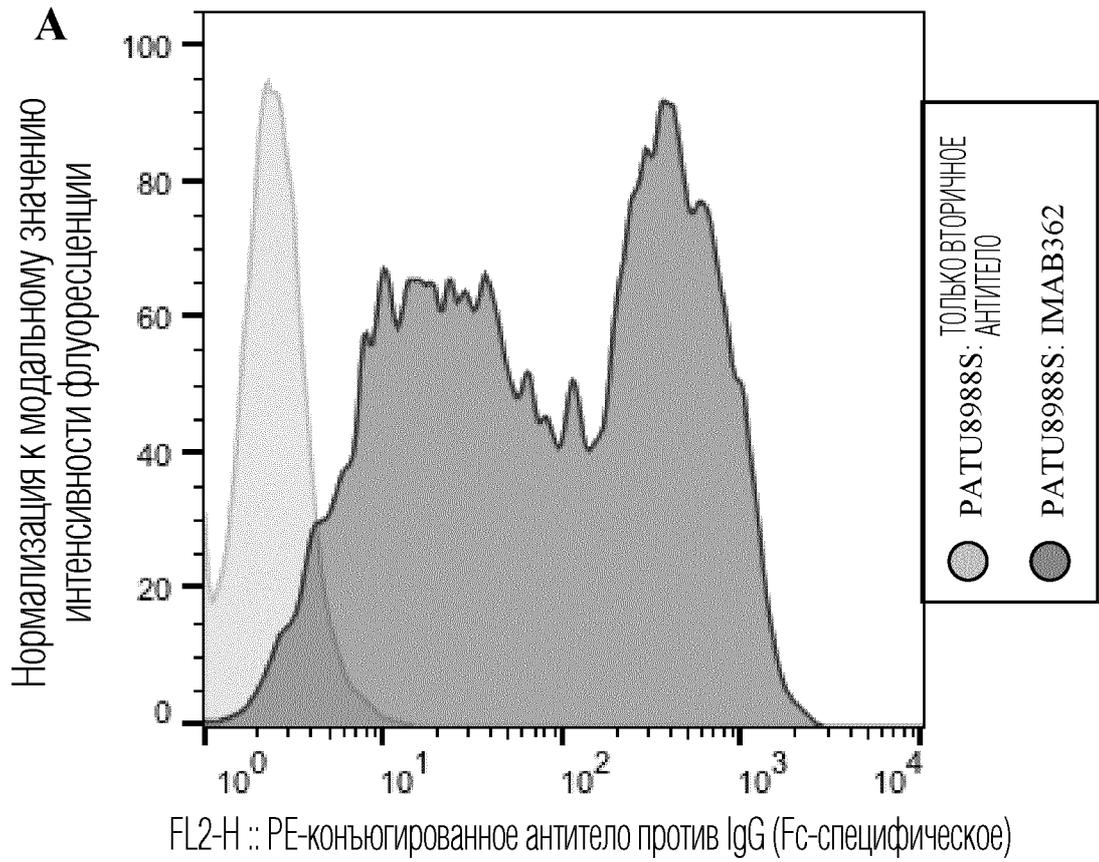




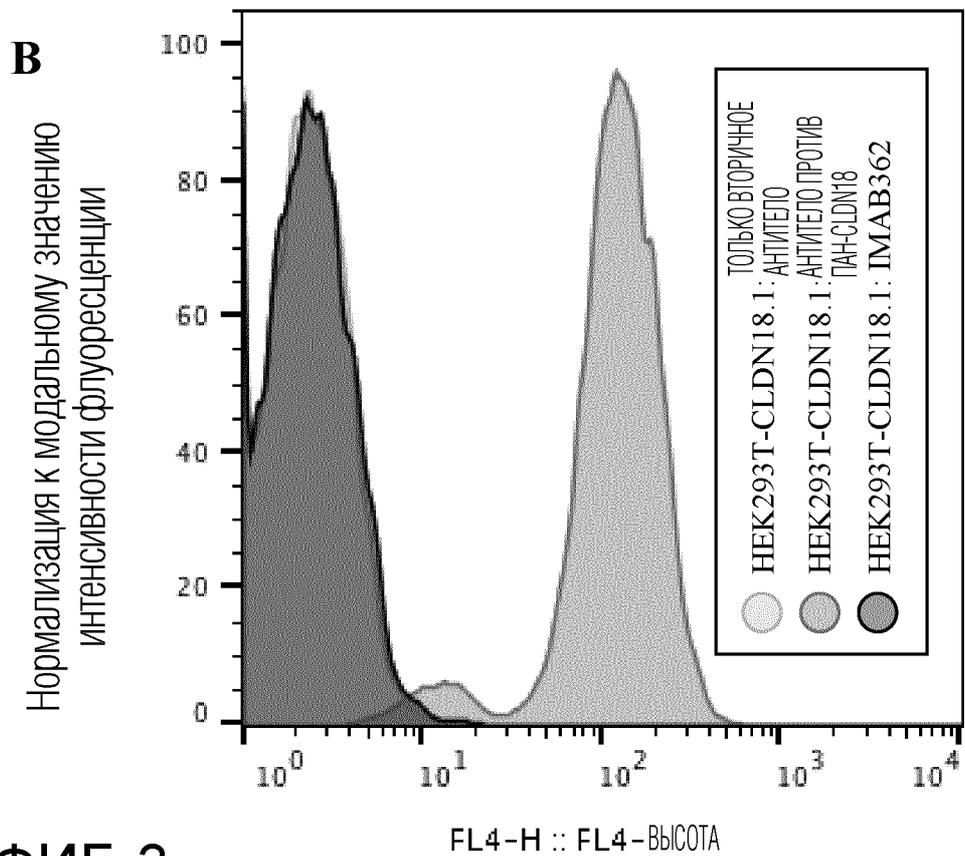
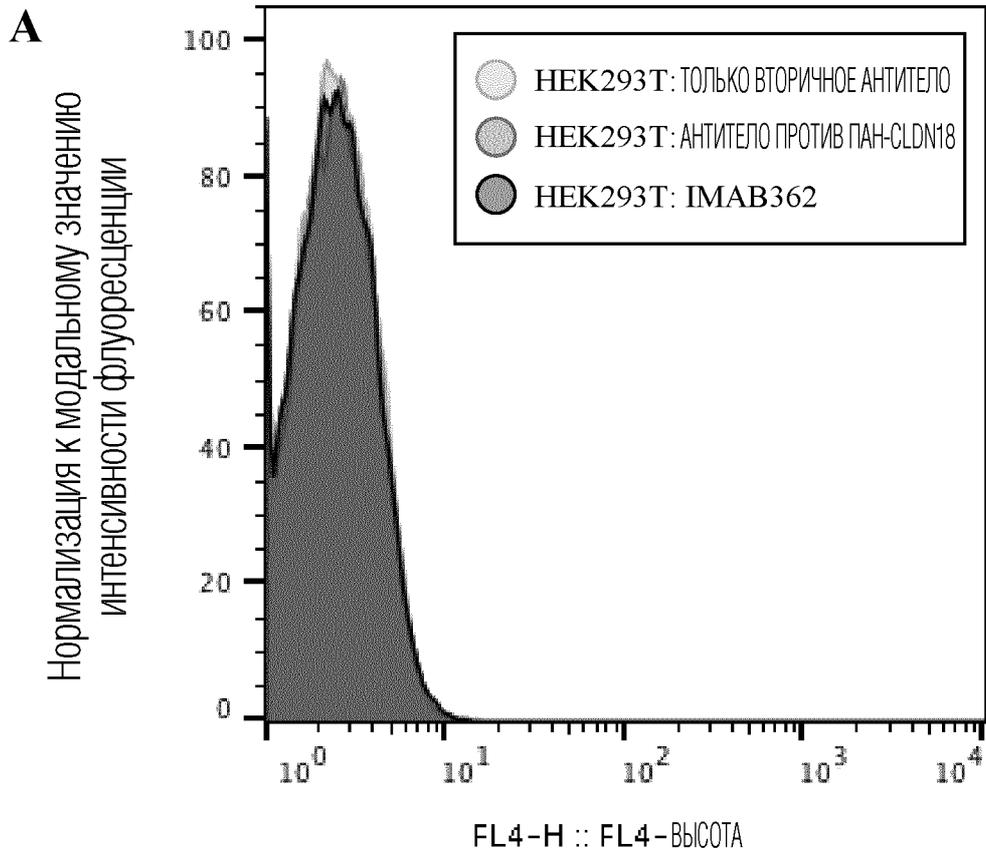




ФИГ. 1В

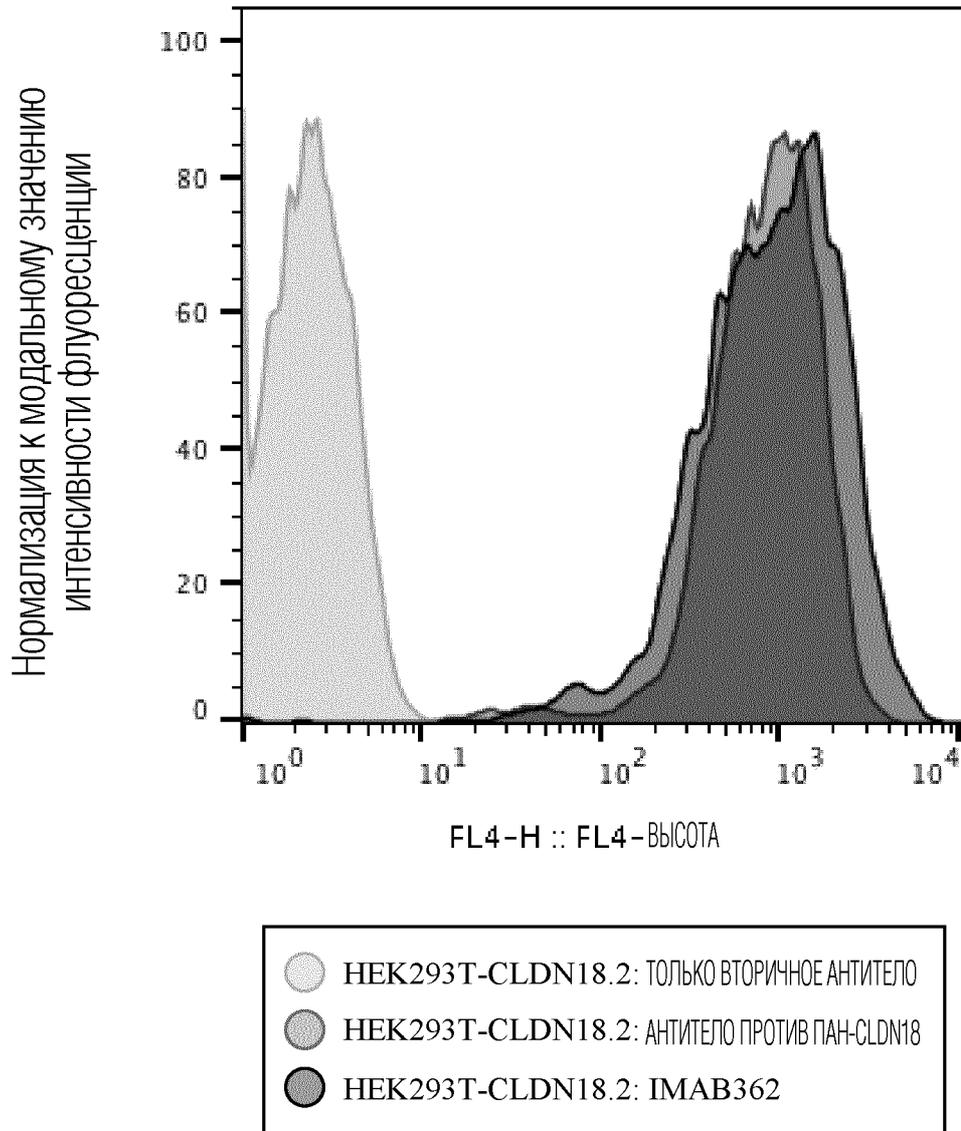


ФИГ. 2

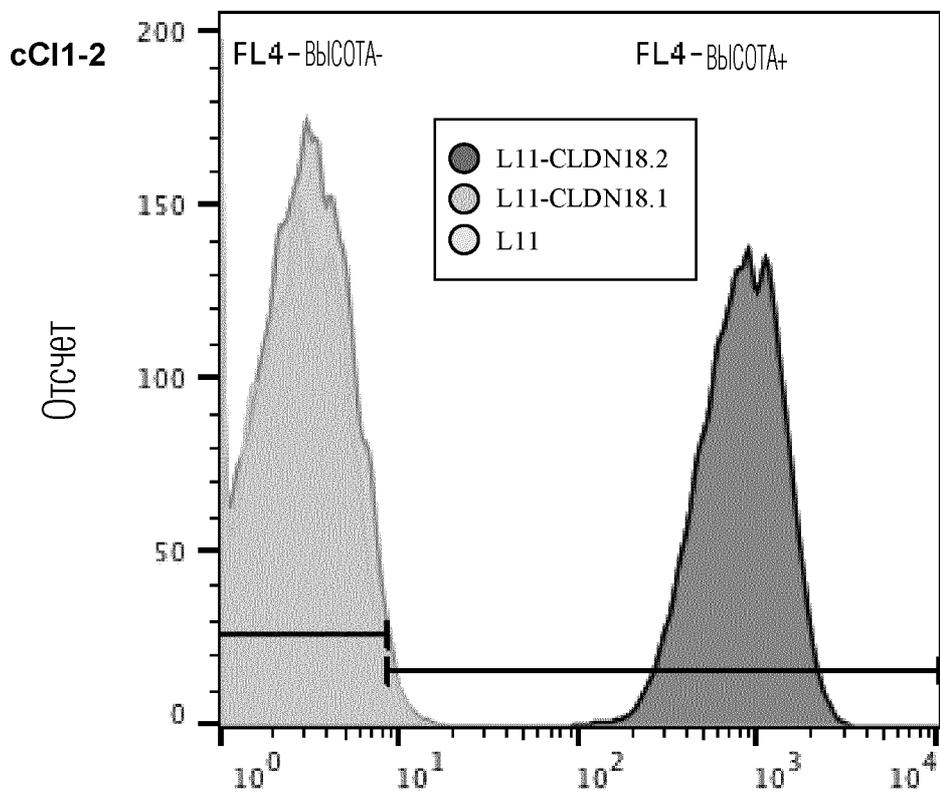
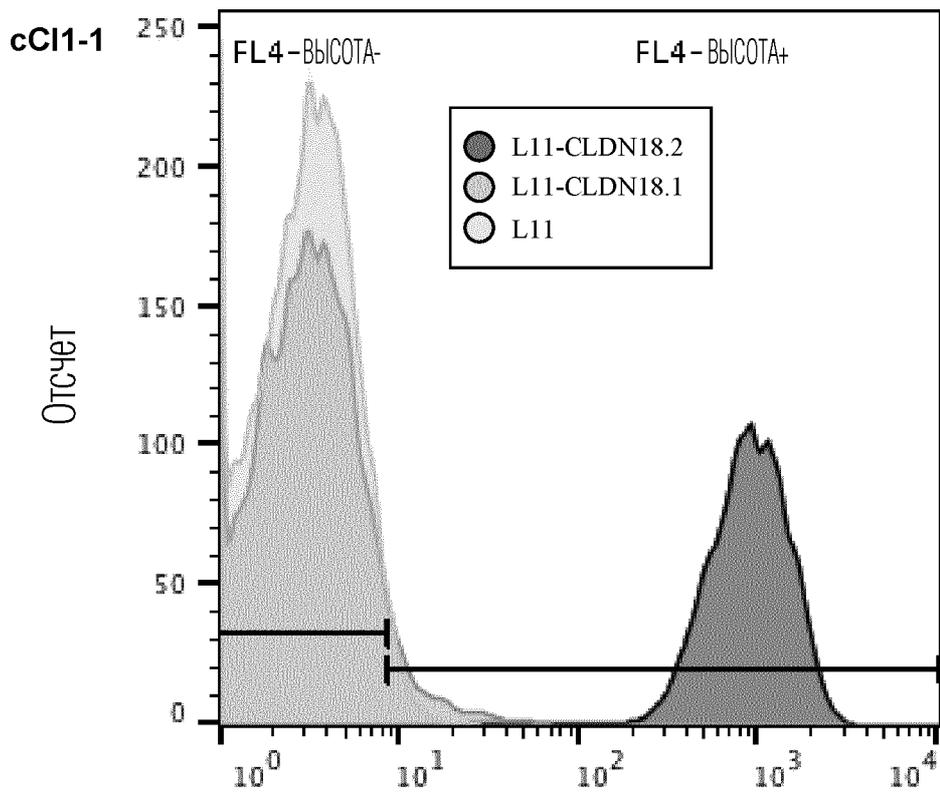


ФИГ. 3

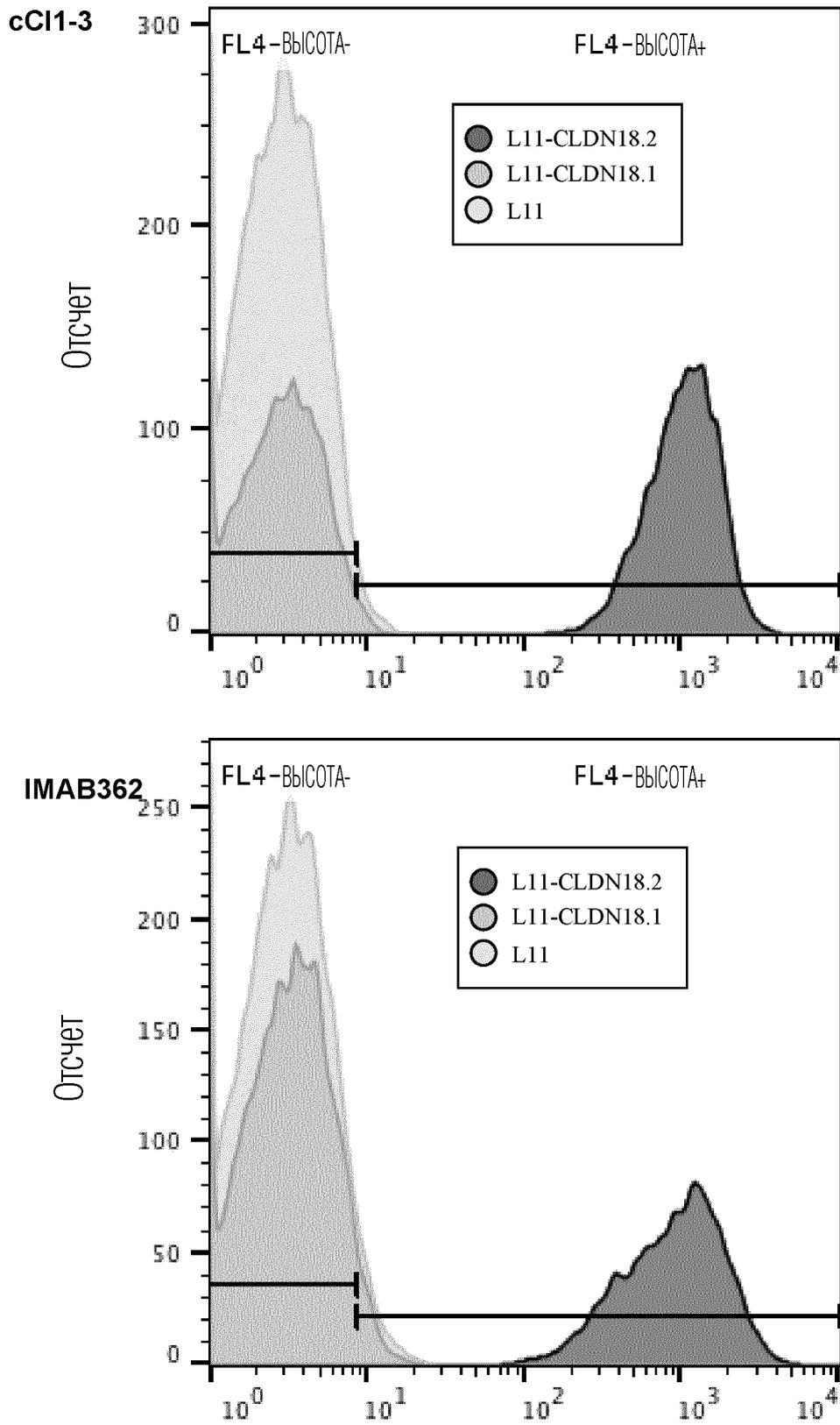
С



ФИГ. 3

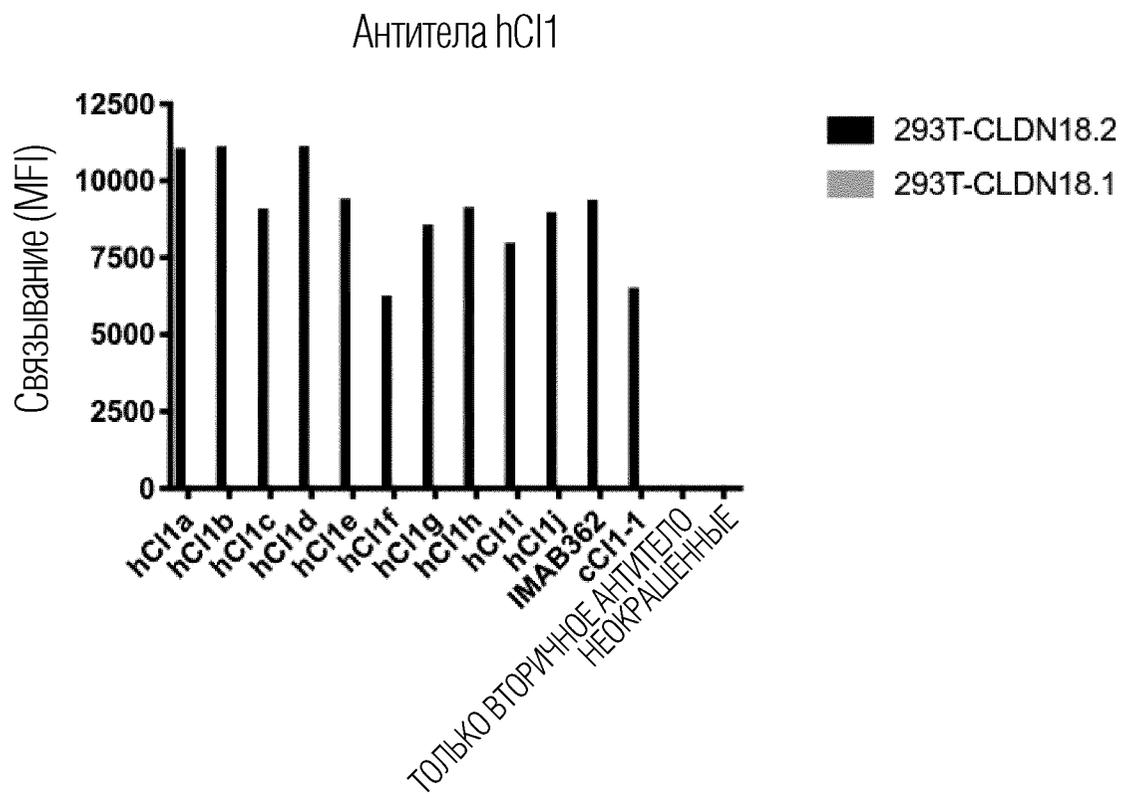


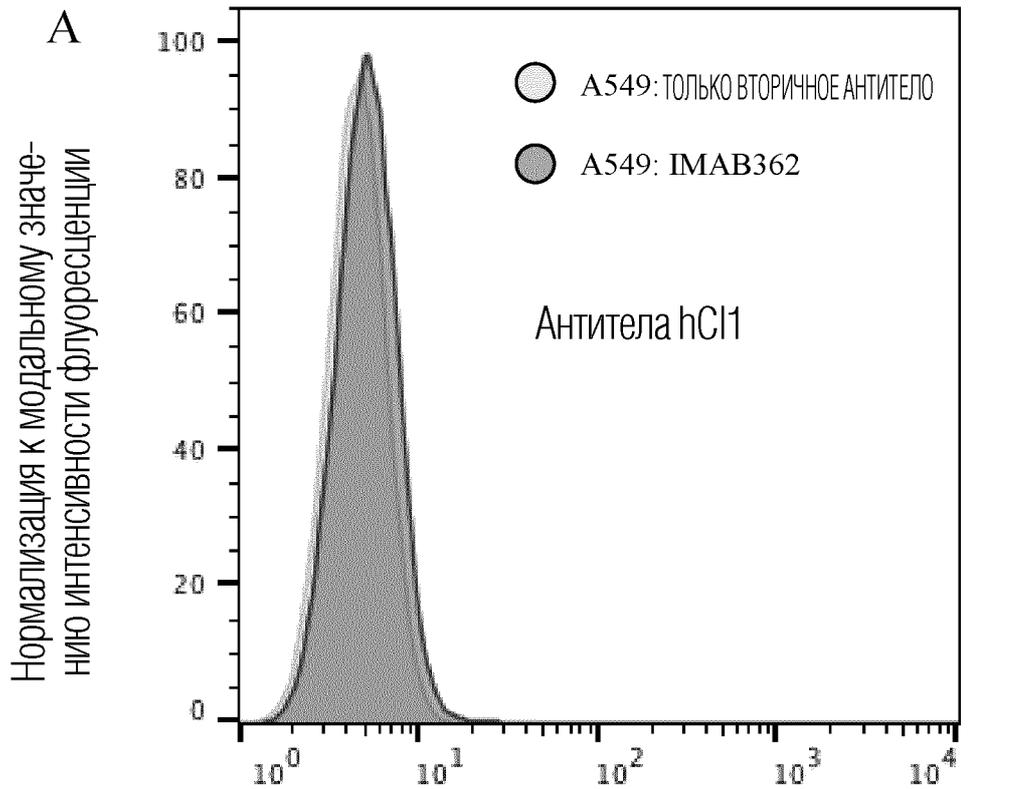
ФИГ. 4



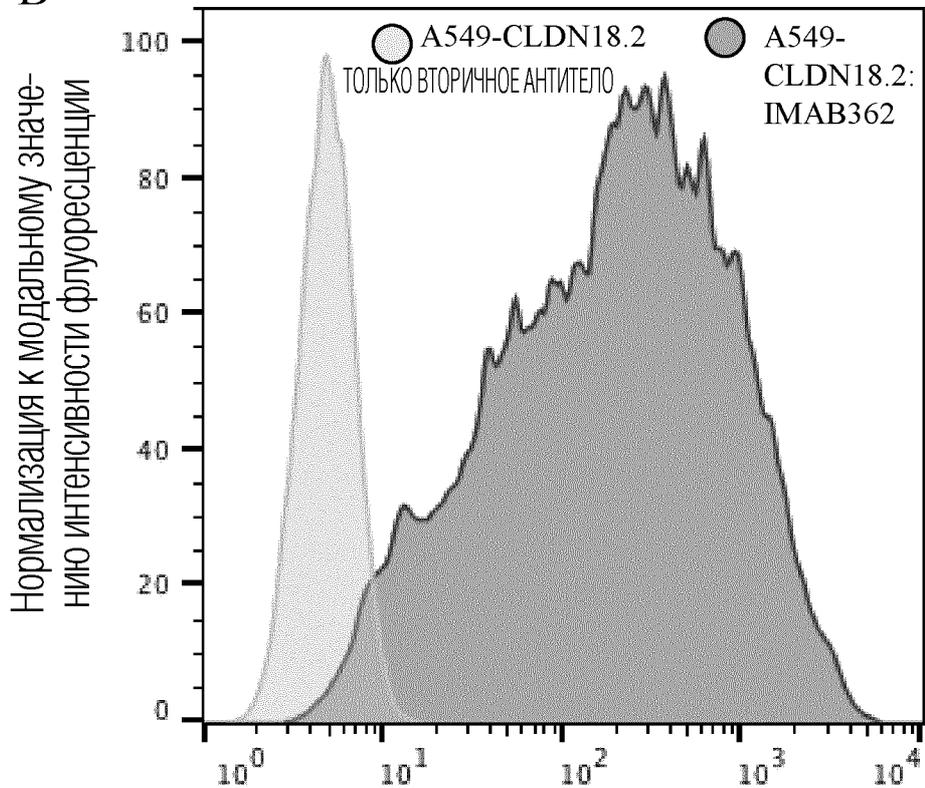
ФИГ. 4

ФИГ. 5



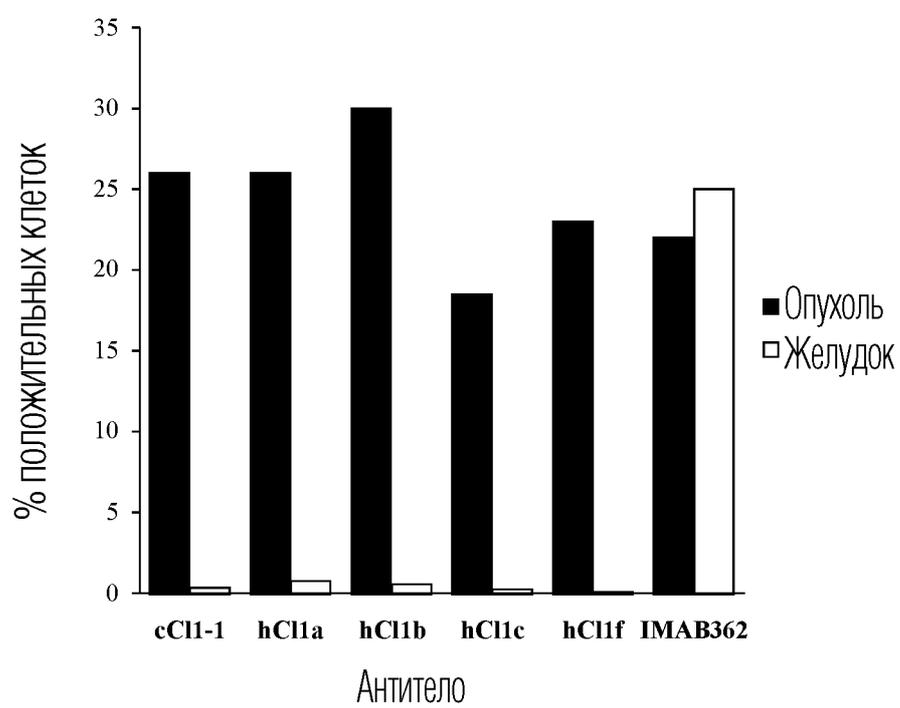


В FL2-H :: PE-конъюгированное антитело против IgG (Fc-специфическое)



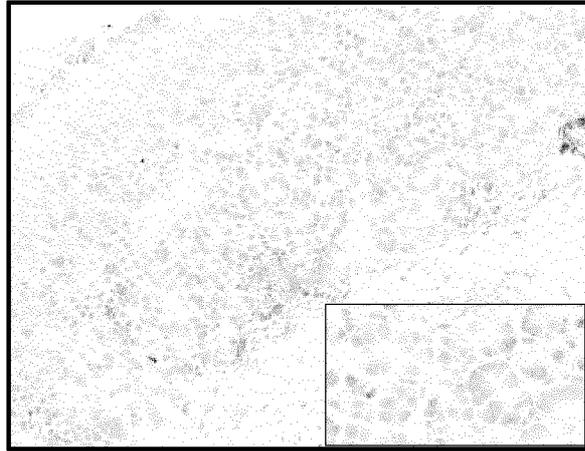
ФИГ. 6

FL2-H :: PE-конъюгированное антитело против IgG (Fc-специфическое)

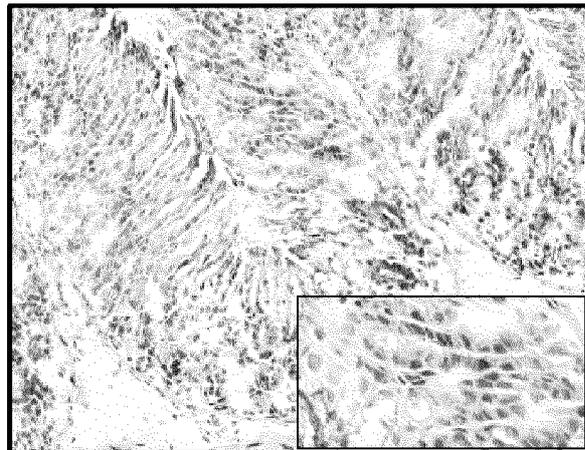


ФИГ. 7

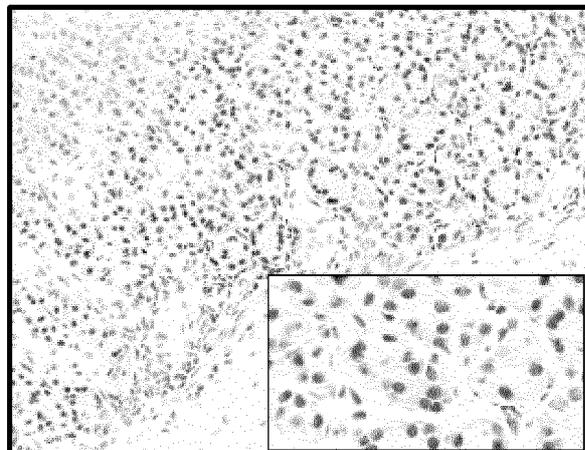
A



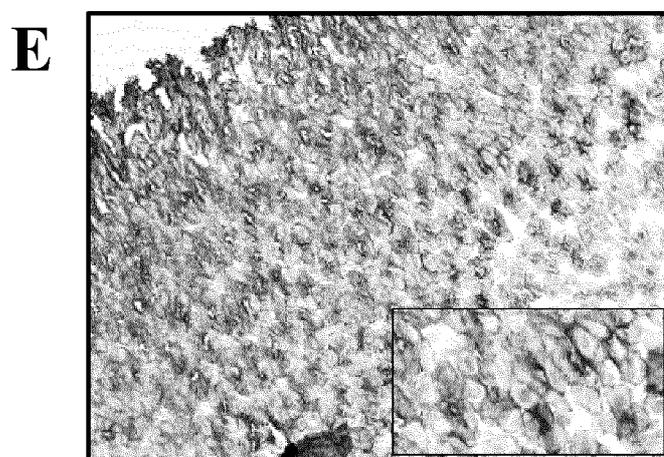
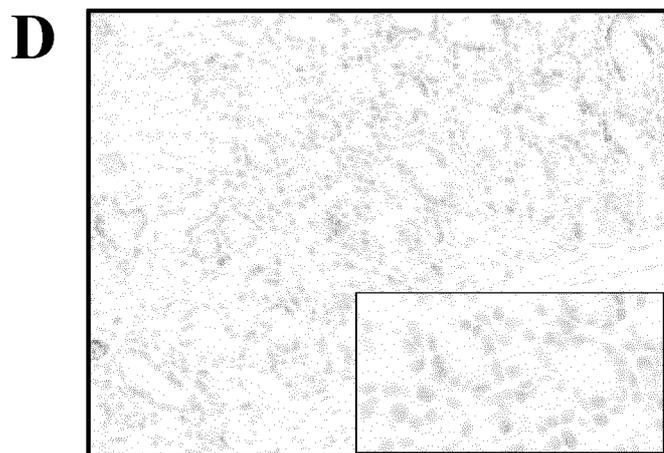
B



C

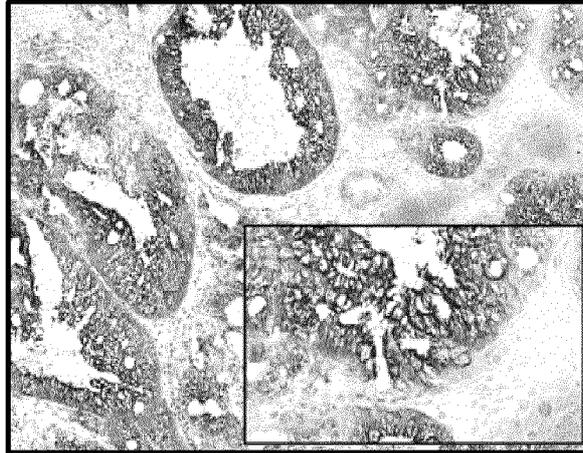


ФИГ. 8

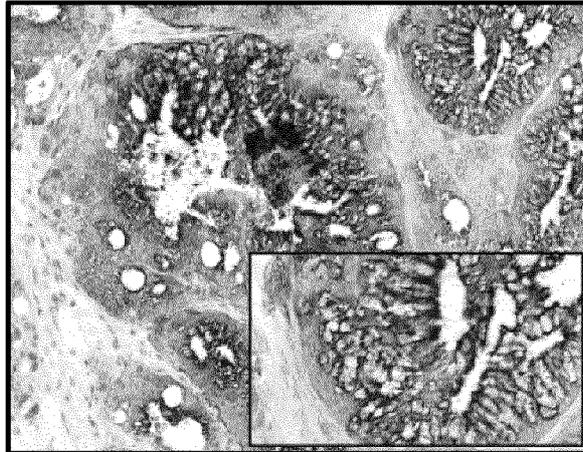


ФИГ. 8

A

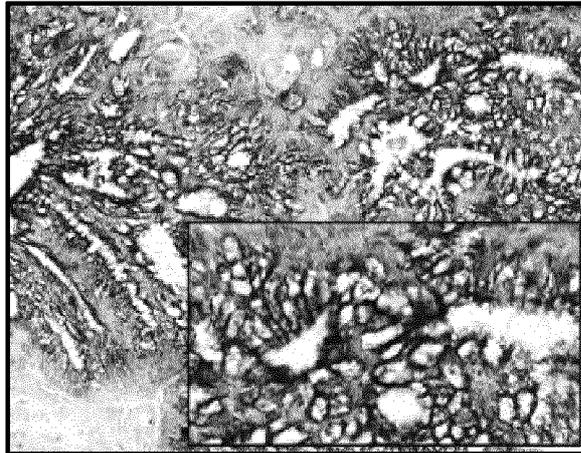


B

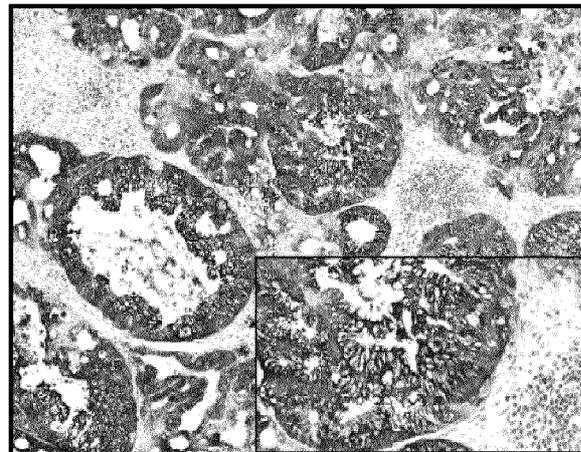


ФИГ. 9

C



D



ФИГ. 9

ФИГ. 10

Стрессовый тест Asp-дезамидирования: связывание с CLDN18.2

