

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293410 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

(22) Дата подачи заявки
2021.06.23

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С КЛАУДИНОМ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) PCT/CN2020/097635;
PCT/CN2021/098416

(32) 2020.06.23; 2021.06.04

(33) CN

(86) PCT/CN2021/101713

(87) WO 2021/259304 2021.12.30

(71) Заявитель:
АНТЕНДЖИН БАЙОЛОДЖИКС
ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:
Хоу Бин, Чэнь Пэн, Юйвэнь Хуэй,
Шань Бо, Мэй Джей (CN)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены антитела к CLDN18 или их антигенсвязывающие фрагменты, выделенные полинуклеотиды, кодирующие указанные антитела или фрагменты, содержащие их фармацевтические композиции и их применения.

A1

202293410

202293410

A1

PCT/CN2021/101713

МПК: C07K 16/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С КЛАУДИНОМ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителам, фармацевтическим композициям и способам предупреждения, лечения и/или диагностики заболеваний, связанных с CLDN-18.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Клаудины (CLDN) представляют собой семейство интегральных мембранных белков, которые включают основной структурный белок плотных контактов в поляризованных типах клеток, таких как эпителиальные или эндотелиальные клеточные пласты, и, как было обнаружено, являются биологическим маркером различных опухолей.

CLDN подвергаются эндоцитозу, и время оборота некоторых CLDN является коротким по сравнению с другими мембранными белками (Van Raffle et al., 2004, PMID: 15366421). В раковых клетках нарушена регуляция экспрессии CLDN и нарушены структуры плотных контактов между опухолевыми клетками. Эти свойства позволяют антителам селективно связываться с клаудиновыми белками в опухолевых тканях и не связываться в нормальных. Хотя антитела, специфичные к отдельным клаудинам, пригодны для применения, также возможно, что полиреактивные антитела к клаудину или антитела к пан-клаудину с большей вероятностью будут способствовать доставке полезной нагрузки более широкой популяции пациентов ввиду более высокой плотности агрегированного антигена, что снижает вероятность пропуска опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии антигена любого индивидуального клаудина.

CLDN18.1, изоформа 1 CLDN 18, специфична для легких и ее количество заметно снижено при аденокарциноме легких. CLDN18.2, изоформа 2 CLDN 18, физиологически ограничена плотными контактами слизистой оболочки желудка, эпитопы которых будут экспонироваться на поверхности раковых клеток при злокачественной трансформации, и демонстрирует высокую экспрессию в значительной части аденокарцином желудка и поджелудочной железы, что делает его потенциальной мишенью для лечения аденокарциномы желудка и поджелудочной железы. Были исследованы и разработаны моноантитела, биспецифичные антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство и т. д., нацеленные на CLDN18.2 (Zhu et al., Targeting CLDN18.2 by CD3 Bispecific and ADC Modalities for the Treatments of Gastric and pancreatic Cancer; Tureci et al., Characterization of zolbetuximab in pancreatic cancer models, Oncoimmunology 2019, vol.8, no.1, e1523096)). В частности, моноклональное антитело золбетуксимаб (ранее известное как IMAB362), созданное против CLDN18.2, получило предварительные результаты исследования FAST фазы II в июне 2016 года, что предполагает его эффективность при раке желудка поздней стадии.

Однако амплитуда антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксичности (CDC) напрямую коррелирует с уровнями CLDN18.2 на поверхности клеток (Tureci et al., Characterization of zolbetuximab in pancreatic cancer models, Oncoimmunology 2019, vol.8, no.1, e1523096). Следовательно, для раковых клеток с низкой экспрессией CLDN18.2, таких как рак молочной железы, терапевтический эффект антител против CLDN18.2 является слабым.

Таким образом, существует потребность в антителе к CLDN18.2, которое имеет усиленную ADCC и/или CDC для раковых клеток, возможных раковых клеток с низкой поверхностной экспрессией CLDN18.2.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты и их модификация, а также фармацевтические композиции и способы

применения для лечения/предупреждения/диагностики состояний, связанных с CLDN 18, в частности связанных с CLDN18.2.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с клаудином-18 (CLDN 18), где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 20, 22, 27, 29, 31, 36, 38, 40, 45, 47, 49, 54, 56, 58, 63, 65, 67, 72, 74, 81, 83, 85, 90, 92, 94, 99, 101, 103, 108, 110, 112, 117, 119, 121, 126, 128, 130, 135, 137, 139, 144, 146, 148, 153, 155, 157, 163, 165, 167, 172, 174, 176, 181, 183, 185, 190, 192, 194, 198, 200, 202, 207, 209, 211, 216, 218, 220, 225, 227, 229, 234, 236, 238, 243, 245, 247, 252, 254, 256, 261, 263, 265, 270, 272, 274, 279, 281, 283, 288, 290, 292, 297, 299, 301, 306, 308, 310, 315, 317, 319, 324, 326, 328, 333, 335, 337, 342, 344, 346, 351, 353, 355, 360, 362, 364, 369, 371, 373, 378, 380, 382, 387, 389, 391, 396, 398, 400, 405, 407, 409, 414, 416, 418, 423, 425, 427, 432, 434, 436, 441, 443, 445, 450, 452, 454, 459, 461, 463, 468, 470, 472, 477, 479, 481, 486, 488, 490, 495, 497, 499, 504, 506, 508, 513, 515, 517, 522, 524, 526, 531, 533, 535, 540, 542, 544, 549, 551, 553, 558, 560, 562, 567, 569, 571, 576, 578, 580, 585, 587, 589, 594, 596, 598, 603, 605, 607, 612, 614, 616, 621, 623, 625, 630, 632, 634, 639, 641, 643, 648, 650, 652, 657, 659, 661, 666, 668, 670, 675, 677, 679, 684, 686, 688, 693, 695, 726, 727, 728 и 697.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую 1, 2 или 3 VH-CDR, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 20, 22, 36, 38, 40, 54, 56, 58, 72, 74, 90, 92, 94, 108, 110, 112, 126, 128, 130, 144, 146, 148, 163, 165, 167, 181, 183, 185, 198, 200, 202, 216, 218, 220, 234, 236, 238, 252, 254, 256, 270, 272, 274, 288, 290, 292, 206, 308, 310, 324, 326, 328, 342, 344, 346, 360, 362, 364, 378, 380, 382, 396, 398, 400, 414, 416, 418, 432, 434, 436, 450, 452, 454, 468, 470, 472, 486, 488, 490, 504, 506,

508, 522, 524, 526, 540, 542, 544, 558, 560, 562, 576, 578, 580, 594, 596, 598, 612, 614, 616, 630, 632, 634, 648, 650, 652, 666, 668, 670, 684, 686, 726, 727 и 688.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую 1, 2 или 3 VL-CDR, имеющих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29, 31, 45, 47, 49, 63, 65, 67, 81, 83, 85, 99, 101, 103, 117, 119, 121, 135, 137, 139, 153, 155, 157, 172, 174, 176, 190, 192, 194, 207, 209, 211, 225, 227, 229, 243, 245, 247, 261, 263, 265, 279, 281, 283, 297, 299, 301, 315, 317, 319, 333, 335, 337, 351, 353, 355, 369, 371, 373, 387, 389, 391, 405, 407, 409, 423, 425, 427, 441, 443, 445, 459, 461, 463, 477, 479, 481, 495, 497, 499, 513, 515, 517, 531, 533, 535, 549, 551, 553, 567, 569, 571, 585, 587, 589, 603, 605, 607, 621, 623, 625, 639, 641, 643, 657, 659, 661, 675, 677, 679, 693, 695, 728 и 697.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, содержит:

i. VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 163, 181, 198, 216, 234, 252, 270, 288, 206, 324, 342, 360, 378, 396, 414, 432, 450, 468, 486, 504, 522, 540, 558, 576, 594, 612, 630, 648, 666 и 684;

ii. VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 165, 183, 200, 218, 236, 254, 272, 290, 308, 326, 344, 362, 380, 398, 416, 434, 452, 470, 488, 506, 524, 542, 560, 578, 596, 614, 632, 650, 668, 726, 727 и 686; и

iii. VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY и SEQ ID NO: 22, 40, 58, 94, 112, 130, 148, 167, 185, 202, 220, 238, 256, 274, 292, 310, 328, 346, 364, 382, 400, 418, 436, 454, 472, 490, 508, 526, 544, 562, 580, 598, 616, 634, 652, 670 и 688.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, содержит:

i. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 45, 63, 81, 99, 117, 135, 153, 172, 190, 207, 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369, 387, 405, 423, 441, 459, 477, 495, 513, 531, 549, 567, 585, 603, 621, 639, 657, 675, 728 и 693;

ii. VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 174, 192, 209, 227, 245, 263, 281, 299, 317, 335, 353, 371, 389, 407, 425, 443, 461, 479, 497, 515, 533, 551, 569, 587, 605, 623, 641, 659, 677 и 695; и

iii. VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 49, 67, 85, 103, 121, 139, 157, 176, 194, 211, 229, 247, 265, 283, 301, 319, 337, 355, 373, 391, 409, 427, 445, 463, 481, 499, 517, 535, 553, 571, 589, 607, 625, 643, 661, 679 и 697.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, содержит:

i. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

ii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

iii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

iv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность GDY;

xiv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256;

xv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274;

xvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292;

xvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310;

xviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328;

xix. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 344, 726 и 727, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346;

xx. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 364;

xxi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 382;

xxii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 396, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 398, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 400;

xxxii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 576, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 578, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 580;

xxxiii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 594, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 596, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 598;

xxxiv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 612, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 614, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 616;

xxxv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 630, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 632, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 634;

xxxvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 648, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 650, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 652;

xxxvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 666, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 668, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 670; или

xxxviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 684, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 686, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 688.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, дополнительно содержит:

i. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

- ii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;
- iii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;
- iv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; или
- v. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;
- vi. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121;
- vii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139;
- viii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157;
- ix. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 172, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 176;
- x. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 190, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194;

- xii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 209, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211;
- xiii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229;
- xiv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 243, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 245, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 247;
- xv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265;
- xvi. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283;
- xvii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 297, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 299, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301;
- xviii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319;
- xix. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 351 или SEQ ID NO: 728, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 355;

xxxviii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 693, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 695, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 697.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, содержит:

i. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

ii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;

iii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;

iv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность GDY, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL-CDR 2, имеющую

xiv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 252, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 254, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 256, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 261, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265;

xv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283;

xvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 297, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 299, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301;

xvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319;

xviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 326, 726 и 727, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 333 или 728, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337;

xix. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 351, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 355;

xx. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 364, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 369, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 373;

xxi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 382, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 387, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 389, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 391;

xxii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 396, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 398, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 400, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 407, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 409;

xxxvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 666, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 668, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 670, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 675, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 677, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 679; или

xxxviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 684, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 686, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 688, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 693, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 695, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 697.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, содержит пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 25/34, SEQ ID NO: 43/52, SEQ ID NO: 61/70, SEQ ID NO: 79/88, SEQ ID NO: 97/106, SEQ ID NO: 115/124, SEQ ID NO: 133/142, SEQ ID NO: 151/160, SEQ ID NO: 205/214, SEQ ID NO: 223/232, SEQ ID NO: 241/250, SEQ ID NO: 259/268, SEQ ID NO: 277/286, SEQ ID NO: 295/304, SEQ ID NO: 313/322, SEQ ID NO: 331/340, SEQ ID NO: 349/358, SEQ ID NO: 367/376, SEQ ID NO: 385/394, SEQ ID NO: 403/412, SEQ ID NO: 421/430, SEQ ID NO: 439/448, SEQ ID NO: 457/466, SEQ ID NO: 475/484, SEQ ID NO: 493/502, SEQ ID NO: 511/520, SEQ ID NO: 529/538, SEQ ID NO: 547/556, SEQ ID NO: 565/574, SEQ ID NO: 583/592, SEQ ID NO: 601/610, SEQ ID NO: 619/628, SEQ ID NO: 637/646, SEQ ID NO: 655/664, SEQ ID NO: 673/682, SEQ ID NO: 691/161, SEQ ID NO: 170/179, SEQ ID NO: 188/76, или пару гомологичных им последовательностей, имеющих по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%-ную идентичность последовательности и сохраняющую аффинность специфического связывания с CLDN 18.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, содержит:

а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704, SEQ ID NO: 705, SEQ ID NO: 706 и SEQ ID NO: 707, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 708, SEQ ID NO: 709 и SEQ ID NO: 710; или

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 711, SEQ ID NO: 712, SEQ ID NO: 713 и SEQ ID NO: 714, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 715, SEQ ID NO: 716 и SEQ ID NO: 717; или

в) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 719, SEQ ID NO: 720, SEQ ID NO: 721 и SEQ ID NO: 722, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 723, SEQ ID NO: 724 и SEQ ID NO: 725.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, дополнительно содержит одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков, при которых сохраняется аффинность специфичного связывания с CLDN 18. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из указанных замен или модификаций имеет место в одной или более последовательностей CDR и/или в одной или более последовательностей, не являющихся CDR, в вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, дополнительно содержит одну или более замен на неприродные аминокислоты (NNAAs).

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, поликлональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, меченное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, бивалентное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, представляет собой камелизированное однодоменное антитело, диатело, scFv, димер scFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv-фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, ds-диатело, наноантитело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, дополнительно содержит константную область иммуноглобулина. В некоторых воплощениях константная область иммуноглобулина представляет собой константную область легкой цепи λ , легкой цепи κ , тяжелой цепи $\gamma 1$, тяжелой цепи $\gamma 2$, тяжелой цепи $\gamma 3$ или тяжелой цепи $\gamma 4$. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, представляет собой изотип человеческого IgG1.

В некоторых воплощениях константная область иммуноглобулина содержит Fc-область, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 700-703.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, специфично связывается с белком CLDN 18.2. В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент,

предложенное(ый) в настоящем документе, связывается как с белком CLDN 18.1, так и с белком CLDN 18.2.

В некоторых воплощениях аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, с клеткой, экспрессирующей CLDN 18.2, превышает или сопоставима с аффинностью референсного антитела.

В некоторых воплощениях максимальная средняя интенсивность флуоресценции (MFI) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, при связывании с клеткой, экспрессирующей CLDN 18.2, выше MFI референсного антитела.

В некоторых воплощениях референсное антитело представляет собой IMAB362.

В некоторых воплощениях экспрессия CLDN 18.2 на поверхности клетки низкая.

В некоторых воплощениях аффинность связывания определяют с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или иммуноферментного анализа (ELISA).

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, связывается с белком CLDN 18.2 с EC_{50} менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ или менее чем приблизительно 2 нМ.

В некоторых воплощениях антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, связано с одним или более конъюгатных фрагментов. В некоторых воплощениях конъюгатный фрагмент содержит активный агент, радиоактивный изотоп, детектируемую метку, фрагмент, модифицирующий фармакокинетику, или очищающий фрагмент. В некоторых воплощениях конъюгатный фрагмент ковалентно присоединен либо непосредственно либо через линкер.

В другом аспекте настоящее изобретение также включает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, распознающее(ий) тот же сайт антигенной

детерминанты, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе в качестве примеров.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен химерный антигенный рецептор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, трансмембранную область и внутриклеточную сигнальную область.

В некоторых воплощениях указанная внутриклеточная сигнальная область выбрана из группы, состоящей из последовательностей внутриклеточных сигнальных областей CD3, FcγRI, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLRs или их комбинации.

В некоторых воплощениях трансмембранная область содержит трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент или химерный антигенный рецептор, предложенные в настоящем документе.

В некоторых воплощениях выделенный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 24, 42, 60, 78, 96, 114, 132, 150, 204, 222, 240, 258, 276, 294, 312, 330, 348, 366, 384, 402, 420, 438, 456, 474, 492, 510, 528, 546, 564, 582, 600, 618, 636, 654, 672, 690, 169, 187 или гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательности.

В некоторых воплощениях выделенный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 33, 51, 69, 87, 105, 123, 141, 159, 213, 231, 249, 267, 285, 303, 321, 339, 357, 375, 393, 411, 429, 447, 465, 483, 501, 519, 537, 555, 573, 591, 609, 627, 645, 663, 681, 699, 178, 196, или гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательности.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, содержащий полинуклеотид, предложенный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена экспрессионная система хозяина, содержащая вектор, предложенный в настоящем документе, или имеющая полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, интегрированный в его геном. В некоторых воплощениях экспрессионная система хозяина, предложенная в настоящем документе, представляет собой микроорганизм, дрожжи или клетку млекопитающего, где указанный микроорганизм выбран из группы, состоящей из *E. coli* и *B. subtilis*, где дрожжи представляют собой *Saccharomyces*, и клетка млекопитающего выбрана из группы, состоящей из клеток COS, CHO-S, CHO-K1, HEK-293 и 3T3.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен вирус, содержащий вектор, предложенный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ экспрессии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, или химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящем документе, включающий культивирование экспрессионной системы хозяина, предложенной в настоящем документе, в условиях, при которых экспрессируется антитело или антигенсвязывающий фрагмент или химерный антигенный рецептор.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, связанный с одним или более терапевтическими агентами, непосредственно или через линкер.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена модифицированная иммунная клетка, нацеленная на клетки, экспрессирующие CLDN 18.2, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предложенный в настоящем документе, или химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, вектор, предложенный в настоящем документе, или вирус, предложенный в настоящем документе.

В некоторых воплощениях клетки, экспрессирующие CLDN 18.2, выбраны из группы, состоящей из клеток рака желудка, клеток рака поджелудочной железы, клеток рака пищевода, клеток рака легких, клеток рака желчного пузыря, колоректального рака и клеток рака печени.

В некоторых воплощениях указанная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, NK-клетку, моноцит, макрофаг или NKT-лимфоцит.

В некоторых воплощениях модифицированная иммунная клетка, предложенная в настоящем документе, дополнительно обладает одним или более признаком, выбранным из группы, состоящей из следующего:

- i. несет кодирующую последовательность для экзогенного цитокина
- ii. экспрессирует другой химерный антигенный рецептор или их комбинацию,
- iii. экспрессирует хемокиновый рецептор,
- iv. экспрессирует миРНК, которая уменьшает экспрессию ингибитора иммунной контрольной точки или белка, который блокирует ингибитор иммунной контрольной точки,
- v. имеет нокаутированный эндогенный ингибитор иммунной контрольной точки
- vi. экспрессирует секретируемое антитело sc-fv
- vii. экспрессирует костимулирующий белок
- viii. экспрессирует защитный переключатель.

В некоторых воплощениях ингибитор контрольной точки выбран из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в настоящем документе, химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, вектор, предложенный в настоящем документе, вирус, предложенный в

настоящем документе, или модифицированная иммунная клетка, предложенная в настоящем документе, и один или более фармацевтики приемлемый носитель.

В некоторых воплощениях один или более фармацевтики приемлемых носителей выбраны из группы, состоящей из фармацевтически приемлемой жидкости, геля, твердых носителей, водных носителей, неводных носителей, противомикробных агентов, изотонических агентов, буферов, антиоксидантов, анестетиков, суспендирующих/диспергирующих агентов, секвестрирующих или хелатирующих агентов, разбавителей, адъювантов, эксципиентов и нетоксичных вспомогательных веществ.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, дополнительно содержит один или более терапевтических агентов.

В некоторых воплощениях указанные один или более терапевтических агентов выбраны из группы, состоящей из амрубицина, апатиниба мезилата, атрасентана, батабулина, кальцитриола, капецитабина, цилегитида, дазатиниба, декатаниба, эдотекарина, энзастаурина, эрлотиниба, эверолимуса, гиматекана, госсипола, ипилимумаба, лонафарниба, лукантона, нейрадиба, нолатрекседа, облимерсена, олапариба, офатумумаба, ореговомаба, панитумумаба, пазопанибробитекана, регорафениба, талампанела, тегафура, темсиролимуза, тесмилифена, тетрандрин, тицилимумаба, траметиниба, трабектедина, вандетаниба, витеспана, занолимумаба, золендроната, гистрелина, азациитидина, дексразоксана, алемтузумаба, леналидомида, гемтузумаба, кетоконазола, азотистого иприта, ибритумумаба, тиуксетана, децитабина, гексаметилмеламин, бексаротена, тозитумумаба, триоксида мышьяка, эдитроната, циклоспорино, аспарагиназы Эдвина, эпирубицина, оксалиплатина, антитела к PD1, антитела к PDL1, антитела к HER2, ADC к HER2, 5-фторурацила и стронция 89.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий: контейнер и фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем документе; или контейнер и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное(ый) в

настоящем документе, химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, вектор, предложенный в настоящем документе, вирус, предложенный в настоящем документе, или модифицированную иммунную клетку, предложенную в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения связанного с CLDN состояния у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вектора, предложенного в настоящем документе, вируса, предложенного в настоящем документе, или модифицированной иммунной клетки, предложенной в настоящем документе.

В некоторых воплощениях связанное с CLDN состояние представляет собой раковое состояние.

В некоторых воплощениях раковое состояние выбрано из группы, состоящей из рака легкого (например мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), желудочного рака или рака желудка (например, рака желудочно-кишечного тракта), рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы), плоскоклеточного рака, рака брюшины, опухоли головного мозга (например, глиобластомы/мультиформной глиобластомы (GBM), неглиобластомной опухоли головного мозга или менингиомы), глиомы (например, эпендимомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы или смешанной глиомы, такой как олигоастроцитома), рака шейки матки, рака яичника, рака печени (например, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы или карциномы печени), рака мочевого пузыря (например, уротелиального рака), рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, рака эндометрия или матки, карциномы слюнных желез, рака почки или почечного рака (например,

рабдоидной опухоли почки), рака предстательной железы, рака вульвы, рака полового члена, рака анального канала (например, анальной плоскоклеточной карциномы), рака щитовидной железы, рака головы и шеи (например, рака носоглотки), рака кожи (например, меланомы или плоскоклеточного рака), остеосаркомы, саркомы Юинга, хондросаркомы, саркомы мягких тканей (например, рабдомиосаркомы, фибросаркомы, саркомы Капоши), карциноидного рака, рака глаза (например, ретинобластомы), мезотелиомы, лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (например, острого лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (ALL) как Т-клеточного происхождения, так и В-клеточного происхождения, хронического лимфобластного/лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелогенного/миелобластного лейкоза (AML), включая тучноклеточный лейкоз, хронического миелогенного/миелоцитарного/миелобластного лейкоза (CMML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), фолликулярной лимфомы (FL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), лимфомы Беркитта (BL), грибовидного микоза, синдрома Сезари, кожной Т-клеточной лимфомы, опухоли тучных клеток, медуллобластомы, нефробластомы, солитарной плазмоцитомы, миелодиспластического синдрома, хронического и нехронического миелопролиферативного расстройства, опухоли центральной нервной системы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, рака желчного пузыря, идиопатического миелфиброза и рака у детей, такого как детские саркомы (например, нейробластома, рабдомиосаркома и остеосаркома).

В некоторых воплощениях введение осуществляют парентеральным путем, включающим подкожную, внутрибрюшинную, внутривенную, внутримышечную или внутрикожную инъекцию; или непарентеральным путем, включающим трансдермальный, пероральный, интраназальный, внутриглазной, подъязычный, ректальный или местный.

В некоторых воплощениях способ, предложенный в настоящем документе, дополнительно включает введение нуждающемуся в этом субъекту дополнительного терапевтического агента.

В некоторых воплощениях указанный дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: активного агента, визуализирующего агента, цитотоксического агента и ингибитора ангиогенеза, ингибитора киназы, агониста костимулирующей молекулы, блокатора молекулы совместного ингибирования, блокатора молекулы адгезии, антитела к цитокину или его функционального фрагмента, детектируемой метки или репортера, противомикробного средства, агента редактирования генов, бета-агониста, ингибитора вирусной РНК, ингибитора полимеразы, интерферона и микроРНК.

В некоторых воплощениях указанный дополнительный терапевтический агент вводят нуждающемуся субъекту перед введением композиции, предложенной в настоящем документе, после введения композиции, предложенной в настоящем документе, и/или одновременно с композицией, предложенной в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ диагностики связанного с CLDN состояния, включающий обнаружение CLDN с применением антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вектора, предложенного в настоящем документе, вируса, предложенного в настоящем документе, модифицированной иммунной клетки, предложенной в настоящем документе, конъюгата антитело-лекарственное средство, предложенного в настоящем документе, фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, или набора, предложенного в настоящем документе.

В некоторых воплощениях CLDN представляет собой CLDN 18.2 или CLDN 18.1.

В некоторых воплощениях состояние выбрано из группы, состоящей из рака желудка, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легкого, рака желчного пузыря, колоректального рака и рака печени.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ индукции гибели клетки, экспрессирующей CLDN 18.2, включающий приведение клетки, экспрессирующей CLDN 18.2, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе, химерным антигенным рецептором, предложенным в настоящем документе, полинуклеотидом, предложенным в настоящем документе, вектором, предложенным в настоящем документе, вирусом, предложенным в настоящем документе, модифицированной иммунной клеткой, предложенной в настоящем документе, конъюгатом антитело-лекарственное средство, предложенным в настоящем документе, фармацевтической композицией, предложенной в настоящем документе, или набором, предложенным в настоящем документе.

В некоторых воплощениях указанную клетку приводят в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, предложенным в настоящем документе, химерным антигенным рецептором, предложенным в настоящем документе, полинуклеотидом, предложенным в настоящем документе, вектором, предложенным в настоящем документе, вирусом, предложенным в настоящем документе, модифицированной иммунной клеткой, предложенной в настоящем документе, конъюгатом антитело-лекарственное средство, предложенным в настоящем документе, фармацевтической композицией, предложенной в настоящем документе, или набором, предложенным в настоящем документе, *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых воплощениях клетка представляет собой раковую клетку. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку солидной опухоли.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вектора, предложенного в настоящем документе,

вируса, предложенного в настоящем документе, модифицированной иммунной клетки, предложенной в настоящем документе, конъюгата антитело-лекарственное средство, предложенного в настоящем документе, фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, или набора, предложенного в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CLDN состояния у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящем документе, полинуклеотида, предложенного в настоящем документе, вектора, предложенного в настоящем документе, вируса, предложенного в настоящем документе, модифицированной иммунной клетки, предложенной в настоящем документе, конъюгата антитело-лекарственное средство, предложенного в настоящем документе, фармацевтической композиции, предложенной в настоящем документе, или набора, предложенного в настоящем документе, в изготовлении диагностического реагента для обнаружения связанного с CLDN состояния.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, вектор, предложенный в настоящем документе, вирус, предложенный в настоящем документе, модифицированная иммунная клетка, предложенная в настоящем документе, конъюгат антитело-лекарственное средство, предложенный в настоящем документе, фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, набор, предложенный в настоящем документе, для применения в способе лечения связанного с CLDN состояния у нуждающегося в этом субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предложенное (ый) в настоящем документе, химерный антигенный рецептор, предложенный в настоящем документе, полинуклеотид,

предложенный в настоящем документе, вектор, предложенный в настоящем документе, вирус, предложенный в настоящем документе, модифицированная иммунная клетка, предложенная в настоящем документе, конъюгат антитело-лекарственное средство, предложенный в настоящем документе, фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, или набор, предложенный в настоящем документе, для применения в способе обнаружения связанного с CLDN состояния.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигурах 1А и 1В представлен анализ FACS, согласно которому Ab10 связывается с клаудином 18.2 человека, обезьяны или мыши, но не связывается с клаудином 18.1 человека.

На фигуре 2 показано, что chAb10 является более чувствительным к клеткам с низким уровнем экспрессии клаудина 18.2 (например, клеткам GAXC031) по сравнению с IMAB362. С помощью IMAB362 окрашивались некоторые из клеток GAXC031, тогда как chAb10 окрашивает все клетки GAXC031.

На фигуре 3 показан анализ FACS, предполагающий, что аффинность связывания выбранных антител с CHOK1-18.2 и GAXC031 выше или сравнима с эталонным антителом IMAB362 (Tab1) с более высоким максимальным MFI. DLE относится к усиленному Fc IgG1 человека, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 702, которая представляет собой Fc тяжелой цепи IgG1 человека с мутациями S122D, A213L и I215E. 2B1 представляет собой антитело 2B1, включенное в патентную заявку № PCT/CN2017/092381; 2C3 представляет собой антитело 2-C3, включенное в патентную заявку № PCT/US2019/020872; 3E12 представляет собой антитело 3E12, включенное в патентную заявку № PCT/CN2017/092381.

На фигуре 4 показано, что chAb08 проявляет более сильный эффект ADCC по сравнению с IMAB362 в отношении клеток GAXC031.

На фигуре 5 показано, что антитела продемонстрировали более сильный эффект ADCC по сравнению с IMAB362 (Tab1) на клетках GAXC031.

На фигуре 6 показано, что chAb10 и chAb15 проявляли сильную непрямую ADC-цитотоксичность в отношении клеток GAXC031.

На фигурах 7A и 7B показано, что некоторые гуманизированные антитела проявляли одинаковую или слегка сниженную аффинность по отношению к клеткам GAXC031.

На фигурах 8A-8C показано, что антитела, особенно mAb Ab15, проявляли обнаруживаемую аффинность связывания с клетками KatoIII и SNU620, экспрессирующими очень низкий уровень клаудина 18.2, который практически не обнаруживается эталонным антителом IMAB362.

На фигурах 9A-9G показана кинетика связывания шести гуманизированных антител с VLP-клаудином 18.2.

На фигурах 10A-10F показана цитотоксическая активность ADC гуманизированных антител к клаудину 18.2 против клеток CHOK1 или клеток GAXC031, сверхэкспрессирующих клаудин 18.2 человека.

На фигурах 11A и 11B показана эффективность и токсичность mAb Ab15, Ab10, Ab17, Ab 06, Ab 08 и Ab20 *in vivo*.

На фигурах 12A-12J показаны эффективность и токсичность ADC *in vivo* Ab10-vc-MMAF в отношении клеток GAXC03, а на фигуре 12K показаны кривые выживания мышей, получавших Ab10 -vc- MMAF.

На фигурах 13A-13L показаны эффективность и токсичность ADC гуманизированных или химерных антител *in vivo* для клеток GAXC03, а на фигуре 13M показаны кривые выживания мышей, получавших ADC гуманизированных или химерных антител.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Следующее описание изобретения предназначено исключительно для иллюстрации различных воплощений настоящего изобретения. Как таковые, обсуждаемые конкретные модификации не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно,

что могут быть сделаны различные эквиваленты, изменения и модификации, не выходя за рамки объема раскрытия, и понятно, что такие эквивалентные воплощения должны быть включены в объем настоящего изобретения. Все цитируемые в настоящий документ ссылки, включая публикации, патенты и патентные заявки, полностью включены в него посредством ссылки.

Определения

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к любому иммуноглобулину, моноклональному антителу, поликлональному антителу, диатам, наноантителам, линейным антителам, одноцепочечным антителам, поливалентному антителу, бивалентному антителу, моновалентному антителу, мультиспецифическому антителу, биспецифическому антителу, их антигенсвязывающему фрагменту, который связывается со специфическим антигеном, их мутантам или любой другой модифицированной конфигурации молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности, включая гликозилированные варианты антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. «Моноклональное антитело» относится к гомогенной популяции антител, а «поликлональное антитело» относится к гетерогенной популяции антител. Эти два термина не ограничивают источник антитела или способ его получения.

Типичное полное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области и первой, второй и третьей константных областей, тогда как каждая легкая цепь состоит из вариабельной области и константной области. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируются как α , δ , ϵ , γ или μ , а легкие цепи млекопитающих классифицируются как λ или κ . Антитело имеет Y-образную форму со стержнем Y, состоящим из второй и третьей константных областей двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидной связью. Каждое плечо Y включает вариабельную область и первую константную область одиночной тяжелой цепи, связанные с вариабельной и константной областями одиночной легкой цепи. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена.

Вариабельные области в обеих цепях обычно содержат три гипервариабельные петли, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR). В частности, вариабельная область легкой цепи (VL) в легкой цепи содержит VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, а вариабельная область тяжелой цепи (VH) в тяжелой цепи включает VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3. Три CDR легкой или тяжелой цепи расположены между фланкирующими участками, известными как каркасные области (FR), которые являются более консервативными, чем CDR, и образуют каркас для поддержки гипервариабельных петель. Границы FR и CDR могут быть определены или идентифицированы с использованием методологии, известной в данной области техники, например, с помощью определения по системе Kabat, определения по системе Chothia, определения AbM, IMGT (см., например, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. *et al.*, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia *et al.*, (1989) Nature 342:877; Chothia, C. *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Al-lazikani *et al* (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948; Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004); Marie-Paule Lefranc *et al*, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc *et al*, Immunome Research, 1(3), (2005); и Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015), hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs). Константные области тяжелой и легкой цепей не участвуют в связывании антигена, но выполняют различные эффекторные функции. Антитела разделяют на классы на основании аминокислотной последовательности константной области их тяжелой цепи. Выделяют пять основных классов или изотипов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые характеризуются наличием тяжелых цепей α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Некоторые основные классы антител делятся на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь $\gamma 1$), IgG2 (тяжелая цепь $\gamma 2$), IgG3 (тяжелая цепь $\gamma 3$), IgG4 (тяжелая цепь $\gamma 4$), IgA1 (тяжелая цепь $\alpha 1$) или IgA2 (тяжелая цепь $\alpha 2$).

Используемый в настоящем документе термин «бивалентный» относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, имеющему два сайта связывания

антигена. Два сайта связывания антигена могут связываться с одним и тем же антигеном или каждый из них может связываться с различным антигеном, и в этом случае антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются как «биспецифичные».

Термин «моновалентный» относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему только один единственный антигенсвязывающий сайт; и термин «поливалентный» относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему несколько (то есть более двух) антигенсвязывающих сайтов.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к фрагменту антитела, образованному из части интактного антитела, содержащей одну или более CDR, или к любому другому фрагменту антитела, который может связываться с антигеном, но не содержит интактной нативной структуры антитела. Примеры антигенсвязывающего фрагмента включают, без ограничения, камелизированное однодоменное антитело, диатело, молекулу одноцепочечного антитела (scFv), димер scFv (бивалентное диатело), стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифичный dsFv (dsFv-dsFv'), Fv-фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, наноантитело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело, стабилизированное дисульфидом диатело (ds-диатело), биспецифичное ds-диатело, мультиспецифичное антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не имеет полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела (например, исходный scFv).

«Fab» в отношении антитела относится к части антитела, состоящей из одной легкой цепи (как вариабельной, так и константной области), связанной с вариабельной областью и первой константной областью одиночной тяжелой цепи дисульфидной связью.

«Fab» относится к Fab-фрагменту, который включает часть шарнирной области.

«F(ab')₂» относится к димеру Fab'.

«Fv» в отношении антитела относится к наименьшему фрагменту антитела, имеющему полный сайт связывания антигена. Фрагмент Fv состоит из вариабельной области одной легкой цепи, связанной с вариабельной областью одной тяжелой цепи.

«dsFv» относится к стабилизированному дисульфидом фрагменту Fv, в котором связь между вариабельной областью одиночной легкой цепи и вариабельной областью одиночной тяжелой цепи представляет собой дисульфидную связь. В некоторых воплощениях «(dsFv)₂» или «(dsFv-dsFv')» содержит три пептидные цепи: два фрагмента V_H, связанные пептидным линкером (например, длинным гибким линкером) и связанные с двумя фрагментами V_L, соответственно, через дисульфидные мостики. В некоторых воплощениях dsFv-dsFv' является биспецифичным, при этом каждая связанная дисульфидной связью пара тяжелой и легкой цепи имеет различную антигенную специфичность.

«Одноцепочечное Fv-антитело» или «scFv» относится к сконструированному антителу, состоящему из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, соединенных друг с другом непосредственно или через пептидную линкерную последовательность (Huston JS *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).

Термин «камелизированное однодоменное антитело», используемый взаимозаменяемо с термином «антитело с тяжелой цепью» или «HCAb», относится к антителу, которое содержит два домена V_H и не содержит легких цепей (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6,005,079). Антитела с тяжелой цепью первоначально были получены из *Camelidae* (верблюды, дромадеры и ламы). Хотя верблюжьи антитела лишены легких цепей, они имеют аутентичный репертуар связывания антигена (Hamers-Casterman C. *et al.*, Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* Immunology. May;109(1):93-101 (2003). Вариабельный домен тяжелой цепи антитела представляет собой наименьшую известную антигенсвязывающую единицу,

генерируемую адаптивными иммунными реакциями (Koch-Nolte F. *et al.*, FASEB J. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007).

Термин «наноантитело» относится к фрагменту антитела, который состоит из одного домена V_H тяжелой цепи антитела обычного IgG и двух константных доменов тяжелой цепи, например CH2 и CH3.

Термин «диатело» относится к небольшому фрагменту антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами, где указанный фрагмент содержит домен V_H , соединенный с доменом V_L в той же полипептидной цепи (V_H - V_L или V_H - V_L) (см., например, Holliger P. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, тем самым создавая два антигенсвязывающих сайта. Указанные антигенсвязывающие сайты могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены (или эпитопы).

«Доменное антитело» относится к фрагменту антитела, содержащему только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В некоторых случаях два или более домена V_H ковалентно соединяются с пептидным линкером для создания антитела с двухвалентным или поливалентным доменом. Два домена V_H двухвалентного домена антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

В некоторых воплощениях «биспецифичное ds-антитело» представляет собой диатело, нацеленное на два разных антигена (или эпитопа). В некоторых воплощениях «биспецифичное ds-диатело» содержит V_{H1} - V_{L2} (связанные пептидным линкером), связанные с V_{L1} - V_{H2} (также связанные пептидным линкером) через дисульфидный мостик между V_{H1} и V_{L1} .

В некоторых воплощениях «биспецифичный dsFv» или «dsFv-dsFv» содержит три пептидных цепи: фрагмент V_{H1} - V_{H2} , где тяжелые цепи связаны посредством пептидного линкера (например, длинного гибкого линкера) и связаны с фрагментами V_{L1} и V_{L2} ,

соответственно, через дисульфидные мостики, при этом каждая соединенная дисульфидным мостиком в пару тяжелая и легкая цепь обладает специфичностью к антигену.

В некоторых воплощениях «димер scFv» представляет собой бивалентное антитело или бивалентный ScFv (BsFv), содержащее(ий) V_H - V_L (соединенные пептидным линкером), димеризованный с другим фрагментом V_H - V_L , так что V_H одного фрагмента координируются с V_L другого фрагмента и образуют два сайта связывания, которые могут быть нацелены на одни и те же антигены (или эпитопы) или разные антигены (или эпитопы). В конкретных воплощениях «димер scFv» представляет собой биспецифичное антитело, содержащее V_{H1} - V_{L2} (связанные пептидным линкером), ассоциированное с V_{L1} - V_{H2} (также связанными пептидным линкером), так что координируются V_{H1} и V_{L1} , а также координируются V_{H2} и V_{L2} , и каждая координированная пара имеет различную антигенную специфичность.

Термин «Fc» в отношении антитела относится к части антитела, состоящей из второй и третьей константных областей первой тяжелой цепи, связанных со второй и третьей константными областями второй тяжелой цепи посредством дисульфидной связи. Часть Fc антитела отвечает за различные эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, но не участвует в связывании антигена.

Термин «химерный», используемый в настоящем документе, означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую от одного вида, и оставшуюся часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую от другого вида. В иллюстративном примере химерное антитело может содержать константную область, полученную от человека, и переменную область от животного, отличного от человека, такого как мышь. В некоторых воплощениях животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее, например мышь, крысу, кролика, козу, овцу, морскую свинку или хомяка.

Термин «гуманизированный», используемый в данном документе, означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, полученные от

животных, отличных от человека, области FR, полученные от человека, и, когда это возможно, константные области, полученные от человека.

Если не указано иное, термин «клаудин» или «CLDN», используемый в настоящем документе, охватывает любой или все мембранные белки плотных контактов, которые экспрессируются в эпителии и эндотелии и образуют парацеллюлярные барьеры и поры, определяющие проницаемость плотных контактов, и предполагает охват любой формы CLDN, например: 1) нативные непроцессированные молекулы CLDN, «полноразмерные» цепи CLDN или встречающиеся в природе варианты CLDN, включая, например, аллельные варианты; 2) любую форму CLDN, полученную в результате процессинга в клетке, например различные формы сплайсинга, например сплайсированный вариант 1 клаудина 18 (CLDN18.1), сплайсированный вариант 2 клаудина 18 (CLDN18.2) и т.п.; или 3) фрагмент (например, укороченная форма, внеклеточный/трансмембранный домен) или модифицированная форма (например, мутированная форма, гликозилированная/пэгилированная, слитая форма с His-меткой/иммунофлуоресценцией) субъединицы CLDN, полученный с помощью рекомбинантных способов. Используемый в настоящем документе термин «CLDN» может быть получен из любого источника, представляющего собой позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди, обезьяны) и грызуны (например, мыши и крысы).

Термин «клаудин 18» или «CLDN 18» относится к одному члену семейства CLDN с молекулярной массой приблизительно 27,9 кДа, который включает две формы сплайсинга, как описано выше, а именно CLDN18.1 (идентифицируемый по последовательности из NCBI: NP_057453.1 и/или номеру доступа: NM_016369.4 для CLDN18.1 *Homo sapiens*) и CLDN18.2 (идентифицированный по последовательности из NCBI: NP_001002026.1 и/или номеру доступа: NM_001002026.3 для CLDN18.2 *Homo sapiens*).

Термин «антитела к CLDN18» относится к антителу, которое способно специфично связываться с CLDN18. В некоторых воплощениях антитела к CLDN18,

предложенные в настоящем документе, способны связываться как с CLDN18.2, так и с CLDN18.1. В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, способны специфически связываться с CLDN18.2, но не связываются с CLDN18.1 или хуже связываются с CLDN18.1 (например, аффинность связывания с CLDN18.1 по меньшей мере в 10 раз ниже, чем у CLDN18.2, или по меньшей мере в 50 раз ниже, или по меньшей мере в 100 раз ниже, или по меньшей мере в 200 раз ниже). В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, не обладают обнаруживаемой аффинностью связывания с CLDN18.1. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяется с помощью FAC. В некоторых воплощениях аффинность связывания определяется MFI, обнаруживаемой с помощью FAC.

Используемый в настоящем документе термин «специфичное связывание» или «специфично связывается» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, например, между антителом и антигеном. Термин «антитело, которое «специфично связывается» с антигеном или эпитопом хорошо известен в данной области. Говорят, что молекула проявляет «специфичное связывание», если она взаимодействует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном-мишенью, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфично связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, с большей готовностью и/или с большей продолжительностью, чем с другими веществами. Например, антитело, которое специфично (или предпочтительно) связывается с антигеном (CLDN18.2) или его антигенным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывается с этим антигеном-мишенью с большей аффинностью, авидностью, с большей готовностью и/или с большей продолжительностью, чем это антитело связывается с другими антигенами или другими эпитопами того же антигена. Это определение также подразумевает, что, например, антитело, которое специфично связывается с первым антигеном-мишенью, может или не может специфично или предпочтительно

связываться со вторым антигеном-мишенью. Таким образом, «специфичное связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. В некоторых примерах антитело, которое «специфично связывается» с антигеном-мишенью или его эпитопом, может не связываться с другими антигенами или другими эпитопами в том же антигене (то есть обычным способом можно определить только базовую связывающую активность). В качестве альтернативы или в дополнение, антитела к CLDN18, описанные в настоящем документе, могут специфично связываться с CLDN18.2 человека, мыши или макака-резус или его фрагментом по сравнению с CLDN18.1 человека (например, обладая аффинностью связывания по меньшей мере в 10 раз большей к одному антигену, чем к другому согласно определению в одном и том же анализе в одних и тех же условиях).

Используемый в настоящем документе термин «консервативная замена аминокислоты» относится к замене аминокислоты, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором произведена замена аминокислоты. Например, консервативные замены могут быть сделаны среди аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми цепями (например, Met, Ala, Val, Leu и Ile), среди остатков с нейтральными гидрофильными боковыми цепями (например, Cys, Ser, Thr, Asn и Gln), среди остатков с кислыми боковыми цепями (например, Asp, Glu), среди аминокислот с основными боковыми цепями (например, His, Lys и Arg) или среди остатков с ароматическими боковыми цепями (например, Trp, Tyr и Phe). Как известно специалистам, консервативная замена обычно не вызывает существенного изменения конформационной структуры белка и, следовательно, может сохранять биологическую активность белка.

«Процент (%) идентичности последовательности» по отношению к аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) определяется как процент остатков аминокислот (или нуклеиновых кислот) в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам аминокислот (или нуклеиновых кислот) в референсной последовательности, после выравнивания

последовательностей и, при необходимости, введения гэпов, для достижения максимального количества идентичных аминокислот (или нуклеиновых кислот). Консервативная замена аминокислотных остатков может или не может рассматриваться как идентичные остатки. Выравнивание с целью определения процентной идентичности последовательности аминокислот (или нуклеиновых кислот) может быть достигнуто, например, с использованием общедоступных инструментов, таких как BLASTN, BLASTp (доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI), см. также Altschul S.F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215:403–410 (1990); Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402 (1997)), ClustalW2 (доступно на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)), и программное обеспечение ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут использовать параметры по умолчанию, предоставляемые инструментом, или могут настраивать параметры в соответствии с настройками, например, путем выбора подходящего алгоритма.

«Выделенное» вещество изменено руками человека из естественного состояния. Если «выделенная» композиция или вещество существует в природе, оно изменено или удалено из его естественной среды, или соблюдаются оба эти условия. Например, полинуклеотид или полипептид, естественным образом присутствующий в живом организме, не является «выделенным», но тот же самый полинуклеотид или полипептид является «выделенным», если он был достаточно отделен от сосуществующих материалов в своем естественном состоянии, чтобы существовать в практически чистом виде. «Выделенная полинуклеотидная последовательность» относится к последовательности выделенной полинуклеотидной молекулы. В некоторых воплощениях «выделенное антитело» относится к антителу, имеющему чистоту по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, определенную электрофоретическими методами (такими как SDS-PAGE, изоэлектрическое

фокусирование, капиллярный электрофорез) или хроматографические методы (такие как ионообменная хроматография или обращенно-фазовая ВЭЖХ).

«Эффекторные функции» в данном контексте относятся к биологической активности, ассоциированной со связыванием Fc-области антитела с его эффекторами, такими как комплекс C1 и Fc-рецептор. Примеры эффекторных функций включают: комплементзависимую цитотоксичность (CDC), индуцированную взаимодействием антител и компонента комплемента 1q (C1q) на комплексе C1; антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), индуцированная связыванием Fc-области антитела с Fc-рецептором на эффекторной клетке; и фагоцитоз.

Термины «антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» и «ADCC» относятся к клеточно-опосредованной реакции, при которой эффекторные клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR), распознают связанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. «Активность ADCC» или «эффект ADCC» относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с клеткой-мишенью, вызывать реакцию ADCC, как описано выше.

«Клетки-мишени» представляют собой клетки, с которыми специфически связываются антитела, содержащие Fc-участок, как правило, через часть белка, которая находится на С-конце Fc-участка. «Эффекторные клетки» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более рецепторов Fc и выполняют эффекторные функции. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; предпочтительными являются PBMC и NK-клетки. Эффекторные клетки могут быть выделены из их естественного источника, например, из крови или PBMC, как известно в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле полинуклеотида, которая обеспечивает репликацию/клонирование содержащегося в ней

желаемого фрагмента нуклеиновой кислоты или обеспечивает экспрессию белка, кодируемого таким желаемым фрагментом нуклеиновой кислоты при введении в соответствующую клетку-хозяина. Векторы включают как векторы клонирования, так и векторы экспрессии. Термин «вектор экспрессии», используемый в настоящем документе, относится к носителю, в который может быть функционально вставлен кодирующий белок полинуклеотид, чтобы вызвать экспрессию этого белка. Вектор экспрессии может содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать точку начала репликации.

Термин «клетка-хозяин», используемый в настоящем документе, относится к клетке, в которую введен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

Термины «лечение» или «проведение лечение» состояния, используемые в настоящем документе, включают предупреждение или облегчение состояния, замедление начала или скорости развития состояния, снижение риска развития состояния, предупреждение или задержку развития симптомов, связанных с состоянием, уменьшение или прекращение симптомов, связанных с состоянием, создание полной или частичной регрессии состояния, излечение состояния или некоторую их комбинацию.

Термин «связанное с CLDN» состояние, используемый в данном документе, относится к любому заболеванию или состоянию, которое поддается лечению модулятором CLDN или связано с экспрессией или сверхэкспрессией CLDN. В некоторых воплощениях связанное с CLDN состояние связано с CLDN18.2. В некоторых воплощениях состояние, связанное с CLDN18.2, представляет собой раковое состояние. В некоторых воплощениях раковое состояние является положительным в отношении экспрессии или повышенной экспрессии CLDN18.2.

Термин «раковое состояние», используемый в настоящем документе, относится к любому медицинскому состоянию, характеризующемуся злокачественным ростом клеток или новообразованием, аномальной пролиферацией, инфильтрацией или

метастазированием, и включает как солидные опухоли, так и несолидные виды рака. Используемый в настоящем документе термин «солидная опухоль» относится к твердой массе неопластических и/или злокачественных клеток. «Несолидный рак» относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, таким как лейкоз, лимфома, миелома и другим гематологическим злокачественным новообразованиям. Примеры рака или опухоли включают гематологические злокачественные новообразования (например, лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому и В-клеточную лимфому), карциномы ротовой полости (например, губы, языка или глотки), опухоли органов пищеварения (например, пищевода, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, толстой кишки или прямой кишки), брюшины, печени и желчевыводящих путей, поджелудочной железы, дыхательной системы, такой как гортань или легкие (мелкоклеточные и немелкоклеточные), кости, соединительной ткани, кожи (например, меланомы), груди, репродуктивных органов (фаллопиевых труб, матки, шейки матки, яичек, яичников или предстательной железы), мочевыводящих путей (например, мочевого пузыря или почки), головного мозга и эндокринных желез, таких как щитовидная железа. В некоторых воплощениях рак выбран из группы, состоящей из рака легкого (например, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), желудочного рака или рака желудка (например, рака желудочно-кишечного тракта), рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы), плоскоклеточного рака, рака брюшины, опухоли головного мозга (например, глиобластомы/мультиформной глиобластомы (GBM), неглиобластомной опухоли головного мозга или менингиомы), глиомы (например, эпендимомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы или смешанной глиомы, такой как олигоастроцитомы), рака шейки матки, рака яичника, рака печени (например, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карцинома/гепатома или карцинома печени), рака мочевого пузыря (например, уротелиального рака), рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, рака эндометрия или

матки, карциномы слюнных желез, рака почки или почечного рака (например, рабдоидной опухоли почки), рака предстательной железы, рака вульвы, рака полового члена, рака анального канала (например, анальной плоскоклеточной карциномы), рака щитовидной железы, рака головы и шеи (например, рака носоглотки), рака кожи (например, меланомы или плоскоклеточной карциномы), остеосаркомы, саркомы Юинга, хондросаркомы, саркомы мягких тканей (например, рабдомиосаркомы, фибросаркомы, саркомы Капоши), карциноидного рака, рака глаза (например, ретинобластомы), мезотелиомы, лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (например, острого лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (ALL) линии предшественников Т-клеток и В-клеток, хронического лимфобластного/лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелогенного/миелобластного лейкоза (AML), включая тучноклеточный лейкоз, хронического миелогенного/миелоцитарного/миелобластного лейкоза (CMML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), фолликулярной лимфомы (FL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), лимфомы Беркитта (BL), грибовидного микоза, синдрома Сезари, кожной Т-клеточной лимфомы, опухоли из тучных клеток, медуллобластомы, нефробластомы, солитарной плазмоцитомы, миелодиспластического синдрома, хронического и нехронического миелопролиферативного расстройства, опухоли центральной нервной системы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, рака желчного пузыря, идиопатического миелофиброза и рака у детей, такого как саркомы у детей (например, нейробластомы, рабдомиосаркомы и остеосаркомы).

Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что указанный носитель, переносящая среда, разбавитель, эксципиент(ы) и/или соль, как правило, химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами, входящими в состав, и физиологически совместимы с их реципиентом.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству каждого активного агента, необходимого для оказания терапевтического эффекта на субъекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или более другими активными агентами. Специалисту в данной области техники будет очевидно определить, достигло ли количество антитела терапевтического эффекта. Эффективные количества различаются, как признано специалистами в данной области, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и вес, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного способа введения и подобных факторов в пределах знаний и опыта практикующего врача. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области, и эффективное количество в зависимости от них можно установить с помощью не более чем рутинных экспериментов.

Антитела к CLDN18

В настоящем изобретении предложены антитела против CLDN18, каждое из которых содержит одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательностей CDR каждого из иллюстративных антител Ab01-Ab38, как показано в таблице 1. Термин «Ab01-Ab38», используемый в настоящем документе, относится к 38 мышинным моноклональным антителам, имеющим пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, как показано в таблице 1. В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к антителам к CLDN18, которые специфически связываются как с белком CLDN18.2, так и с белком CLDN18.1, такими как антитела, каждое из которых содержит одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательностей CDR каждого из иллюстративных антител Ab01, Ab04 и Ab36-Ab38, как показано в таблице 1. В другом конкретном аспекте настоящее изобретение относится к антителам к CLDN18, которые демонстрируют более высокую аффинность связывания с белком CLDN18.2, чем с белком CLDN18.1, таким как антитела, каждое из

которых содержит один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательности CDR каждого из иллюстративных антител Ab02, Ab03 и Ab05-Ab35, как показано в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности переменных областей иллюстративных антител согласно настоящему изобретению

Антитело №	Вариантная цепь	Аминокислотная последовательность каждой переменной цепи	Аминокислотная последовательность CDR1	Аминокислотная последовательность CDR2	Аминокислотная последовательность CDR3
		SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 22
Ab01	VH	DVQLQESG PGLVKPSQ SLSLTCSVT GYSITSGY YWNWIRQ FPGNKLEW MGYITYDG SNNYNPSL KNRISITRD TSKNQFFL KLNSVTTE DAATYFCA RDPNYYGT TLPAWFVY WGQGTLV TVSA	SGYYWN	YITYDGSN NYNPSLKN	DPNYYGTT LPAWFVY
		SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 31

	VL	DIVVTQSH KFMSTSVG DRVSITCK ASQDVGTA VAWYQQK PGQSPKLLI YWASTRHT GVPDRFTG SGSGTDFT LTISNVQSE DLTDYFCQ QYSSYVTF GAGTKLEL K	KASQDVG T AVA	WASTRHT	QQYSSYVT
		SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40
Ab02	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTSYAI NWVRQPP GKGLEWL GVIWTGGG TNYNSALK SRLSINKD NSKSQVFL KMNSLQTD DTARYYCA RFYDGYYS WFAYWGQ GTLVTVSA	SYAIN	VIWTGGGT NYNSALKS	FYDGYYS WFAY
		SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 49

	VL	DIVMTQSH KFMSTSVG DRVSITCK ASQDVGTA VTWYQQK PGQSPKLLI YWASTRHT GVPDRFTG SGSGTDFT LTISNVQSE DLADYFCQ QYSSYPFTF GSGTKLEI K	KASQDVGT AVT	WASTRHT	QQYSSYPF T
		SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 58
Ab03	VH	EVQLQQSG PELVKPGA SVKIACKA SGYTFTDY NMDWVKQ SHGKSLEW IGNINSYYG GTIYNQKF KGKATLTV DKSSSTAY MVLRLTS EDNAVYY CARPHLGN ALDYWGQ GTSITVSS	DYNMD	NINSYYGG TIYNQKFK G	PHLGNALD Y
		SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67

	VL	DIVVTQSPS SLTVTPGE KVTMSCKS SQSLFNSG NQKNYLS WYQQNPG QPPKLLIY WASTRQSG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAGYYCQ NDYIFPLTF GAGTKLEL K	KSSQSLFNS GNQKNYLS	WASTRQS	QNDYIFPLT
		SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 74	
Ab04	VH	EVQLQQSG PELVKPGA SVKMSCM ASGYTFTD YNIHWVKR SHGSRLEW IGYISPISGG AGYNQKF MDKATLT VDKSSNTA YMELRSLT SEDSAVYY CTRGDYW GQGTTTLV SS	DYNIH	YISPISGGA GYNQKFM D	GDY

		SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 85
	VL	DIVMTQSP SSLAVTVG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRKSG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LGIYYCLN DYGFP LTF GAGSKLEL K	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRKS	LNDYGFPL T
		SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 94
Ab05	VH	DVKLVESG EDLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSNY AMSWVRQ TPEKRLEW VAYVSSGG DYIYYADT VKGRFIISR DNARNTLY LQMNSLRS EDTAMYY CARVYFGN	NYAMS	YVSSGGDY IYYADTVK G	VYFGNSLD Y

		SLDYWGQ GTTLTVSS			
		SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 103
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTLSCK SSQSLLNG GNQKNYLT WYQQRPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTLI ISSVQAEDL AVYYCQN DYYYPWTF GGGTKLEI K	KSSQSLLN GGNQKNY LT	WASTRES	QNDYYYP WT
		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 112
Ab06	VH	EVQLVASG GGLVKPGG SLKLSCAA SGITFRSYA MSWVRQT PEKRLEWV ATITDGGS YIFY PDNVKGRF TISGDHAK NNLYLQMS	SYAMS	TITDGGSYI FYPDNVKG	LYYGNSFA Y

		HLKSEDTA LYFCVRLY YGNSFAY WGQGTLV TVSA			
		SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 121
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTLNCK SSQSLEFNSG NQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TFSSVQAE DLAVYYC QNAYIYPF TFGSGTKL EIK	KSSQSLEFNS GNQKNYLT	WASTRES	QNAYIYPF T
		SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 130
Ab07	VH	EVQLQQSG PELVKPGA SVKISCKAS GYSFTDYF MNWVKQS HGKGLEWI GRINPYNG DTFYNQKF KGKATLTV	DYFMN	RINPYNGD TFYNQKFK G	LYDGYWG AFVY

		DKSSSTAH MELLSLTS EDFAVYYC ALYDGYW GAFVYWG QGTLVTVS A			
		SEQ ID NO: 142	SEQ ID NO: 135	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 139
	VL	DIQMTQSP ASLSVFG ETVTITCRA SENIYSNLA WYQQKQG KSPQLLVY AATNLADG VPSRFGSGS GSGTQYSL KINSLQSED FGSYYCQH FWGTPLTF GAGTKLEL K	RASENIYS NLA	AATNLAD	QHFWGTPL T
		SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 144	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 148
Ab08	VH	QVQLQQPG AELVKPGA SVKLSCKA SGYTFTSY LLHWVKQ RPGQGLEW IGMIHPNG GSTNYNEK	SYLLH	MIHPNGGS TNYNEKFK T	VYFGNSFA Y

		FKTKATLT VDKSSSTA YMLSSLT SEDSAVYY CAPVYFGN SFAYWGQ GTLVTVSA			
		SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 157
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYYYPFT FGSGTKLE KK	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNDYYYPF T
		SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 200	SEQ ID NO: 202
Ab09	VH	EVQLQQSG PELVKPGT SVKMSCKA SGYTFTDY NMHWVKL SHGKSLEW IGYINPNNG	DYNMH	YINPNNGG TIYNQRFK G	QGYYGNS MDY

		GTIYNQRF KGKATLTV NKSSRTAY MDLRSLTS EDSAVYYC ARQGYYG NSMDYWG QGNSVTVS S			
		SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 211
	VL	DIVMTQSP SSLTVTPGE RVTMSCKS SQSLLNGG NQRNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFAGS GSGTDFTL TISRVQAE DLSFYCYCQ NSYFYFPFTF GSGTKLDL R	KSSQSLLN GGNQRNY LT	WASTRES	QNSYFYPF T
		SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 216	SEQ ID NO: 218	SEQ ID NO: 220
Ab10	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSSYT MSWVRQT	SYTMS	TISVIGGNT YYVDSVK G	LGQTQRNA MDY

		PEKRLEWV ATISVIGGN TYYVDSVK GRFTISRDK AKNTLYLQ MSSLRSED TALYYCAR LGQTQRNA MDYWGQG TSVTVSS			
		SEQ ID NO: 232	SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 229
	VL	DIVMTQSP SSLVSAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYSYPLT FGAGTKLE LK	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYSYPL T
		SEQ ID NO: 241	SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 238
Ab11	VH	EVMLVESG GDLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSRYT	RYTMS	TVSVGSGN TYYLDSVK G	LGQTQRNA VDY

		MSWVRQT PEKRLEWV ATVSVGSG NTYYLDSV KGRFTISRD NAKNTLFL QMNSLRSE DTALYYCT RLGQTQRN AVDYWGQ GTSVTVSS			
		SEQ ID NO: 250	SEQ ID NO: 243	SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 247
	VL	DIVMTQSP SFLSVSAG EKVTMSCK SSQSLENG GNQKNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRDSG VPDRFTGS GSGTDFTL TISNVQAE DLAIYFCQ NDHSFPLT FGAGTKLE LK	KSSQSLEF GGNQKNY LA	GASTRDS	QNDHSFPL T
		SEQ ID NO: 259	SEQ ID NO: 252	SEQ ID NO: 254	SEQ ID NO: 256
Ab12	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA	SYTMS	TIIGGYGNT YYADSVK G	LGQTQRNA MDY

		SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATIIGGYG NTYYADSV KGRFTISRD SAKNTLYL QMLSLRSE DTALYYCT RLGQTQRN AMDYWGQ GTSVTVSS			
		SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 261	SEQ ID NO: 263	SEQ ID NO: 265
	VL	DILMTQSPS SLSVSAGE KVTMSCKS SQSLLNSG NQRNYLA WYQQKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDRFTGSG SGTDFTLTI SSVQAEDL AVYYCQN DYYYPLTF GAGTKLEL K	KSSQSLLN SGNQARNYL A	GASTRES	QNDYYYPL T
		SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 274

Ab13	VH	EVRLVESG GGLVKPGG SLKLSCAG SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATITIGVNI YYL DSVKGRFT ISRDNAKN TLYLQMNS LRSED TAL YYCTRLGQ TQRNAMD YWGQGTS VTVSS	SYTMS	TITIGVNIY YLDSVKG	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 286	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 283
	VL	DIVMTQSP TSLSVSAG EKVTMTCK SSQSLLNS GNQKNYL AWYQEKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NNHFYPLT FGAGTKLE LK	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNNHFYPL T

		SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 288	SEQ ID NO: 290	SEQ ID NO: 292
Ab14	VH	QVQLQQPG AELVKPGA SVKLSCKA SGYTFTSY LLHWVKQ RPGQGLEW IGMIHPNG GSTNYNEK FKTKATLT VDKSSSTA YMLSSLT SEDSAVYY CAPVYFGN SFAYWGQ GTLVTVSA	SYLLH	MIHPNGGS TNYNEKFK T	VYFGNSFA Y
		SEQ ID NO: 304	SEQ ID NO: 297	SEQ ID NO: 299	SEQ ID NO: 301
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYYYPFT	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNDYYYPF T

		FGSGTKLE KK			
		SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 306	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 310
Ab15	VH	EVMLVESG GDLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSTYT MSWVRQT PEKRLEWV ATIVGGGG YTYYLDVS KGRFTISR NAKNTLYL QMISLRSE DTALYYCA RMGLTQR NALDYWG QGTSITVSS	TYTMS	TIVGGGGY TYYLDSVK G	MGLTQRN ALDY
		SEQ ID NO: 322	SEQ ID NO: 315	SEQ ID NO: 317	SEQ ID NO: 319
	VL	DIVMTQSP SSLSVSEGE KVTLNCKS SQSLFNSG NQKNYLA WYQQKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDRFTGSG FGTDFTLTI SSVQAEDL	KSSQSLFNS GNQKNYL A	GASTRES	QNDHTYPL T

		AVYYCQN DHTYPLTF GAGAKLEL K			
		SEQ ID NO: 331	SEQ ID NO: 324	SEQ ID NO: 326	SEQ ID NO: 328
Ab16	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFNSY TMSWVRQ TPEKRLEW VATITVIGG NTYYLDSV KGRFTISID NGKNTLYL QMSSLRSE DTALYYCA RMGQTQR NAMDYWG QGTSVTVS S	SYTMS	TITVIGGNT YYLDSVKG	MGQTQRN AMDY
		SEQ ID NO: 340	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 337
	VL	DIVMTQSP SSLVSAG QKVTMRC KSSQSLLN SGNQKNYL AWYQQKL GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFSGS	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYSFPL T

		GSGTDFTL TITSVQAE DLAVYYC QNDYSFPL TFGAGTKL ELK			
		SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 344	SEQ ID NO: 346
Ab17	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTSYAI SWVRQPPG KGLEWLGE IWTGGGTN YN SALKSRLSI SKDNSKSQ VFLKMNSL QTDDTARY YCGRLSYG NSLDYWG QGTTLTVS S	SYAIS	EIWTGGGT NYNSALKS	LSYGNSLD Y
		SEQ ID NO: 358	SEQ ID NO: 351	SEQ ID NO: 353	SEQ ID NO: 355
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNNFIYPLT

		WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TVSSVQAE DLAVYYC QNNFIYPLT FGPGTKLE LK			
		SEQ ID NO: 367	SEQ ID NO: 360	SEQ ID NO: 362	SEQ ID NO: 364
Ab18	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTTYGI NWVRQPP GKGLEWL GVIWGDGS TNYHSALIS RLSISKDNS KSQVFLKL NSLQTDDT ATYYCVKS SYYGNAM DYWGQGT SVTVSS	TYGIN	VIWGDGST NYHSALIS	SSYYGNA MDY
		SEQ ID NO: 376	SEQ ID NO: 369	SEQ ID NO: 371	SEQ ID NO: 373
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG ETVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNVYSYPF T

		QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NVYSYPFT FGSGTKLEI			
		SEQ ID NO: 385	SEQ ID NO: 378	SEQ ID NO: 380	SEQ ID NO: 382
Ab19	VH	EVMLVESG GDLVKPGG SLKLSCAA SGFSFSRYT MSWVRQT PEKRLEWV ATVSVGSG NTYYLDSV KGRFTISRD NAKNTLFL QMSSLRSE DTALYYCA RMGQTQR NAVDYWG QGTSVTVS S	RYTMS	TVSVGSGN TYYLDSVK G	MGQTQRN AVDY
		SEQ ID NO: 394	SEQ ID NO: 387	SEQ ID NO: 389	SEQ ID NO: 391
	VL	DIVMTQSP SSLSVSAG EKVTMSCK SSQSLENSG NQKNYLA	KSSQSLENS GNQKNYL A	GASTRES	QNDHSFPL T

		WYQQKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDRFTGSG SGTDFTLTI SNVQAEDL AVYLCQN DHSFPLTF GAGTKLEL			
		SEQ ID NO: 403	SEQ ID NO: 396	SEQ ID NO: 398	SEQ ID NO: 400
Ab20	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCVA SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATIIGGYG NTYYSDSV KGRITISRD SAKNTLYL QMISLRSE DTALYYCT RLGQTQRN AMDYWGQ GTSVTVSS	SYTMS	TIIGGYGNT YYSDSVKG	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 412	SEQ ID NO: 405	SEQ ID NO: 407	SEQ ID NO: 409
	VL	DILMTQSPS SLSVSAGE KVTMNCK SSQSLLNS GNQKNYL	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYYYPF T

		AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYYYPFT FGAGTKLE L			
		SEQ ID NO: 421	SEQ ID NO: 414	SEQ ID NO: 416	SEQ ID NO: 418
Ab21	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATIIGGYG NTYYVDSV KGRFTISR SAKNTLYL QMISLRSE DTALYYCT RLGQTQRN AMDYWGQ GTSVTVSS	SYTMS	TIIGGYGNT YYVDSVK G	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 430	SEQ ID NO: 423	SEQ ID NO: 425	SEQ ID NO: 427
	VL	DILMTQSPS SLSVSAGE KVTMSCKS SQSLLNSG	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYYYPF T

		NQKNYLA WYQQKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDRFTGSG SGTDFTLTI SSVQAEDL AVYYCQN DYYYPFTF GAGTKLEL			
		SEQ ID NO: 439	SEQ ID NO: 432	SEQ ID NO: 434	SEQ ID NO: 436
Ab22	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATIIGGYG NTYYADSV KGRFTISRD SAKNTLYL QMISLRSE DTALYYCT RLGQTQRN AMDYWGQ GTSVTVSS	SYTMS	TIIGGYGNT YYADSVK G	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 448	SEQ ID NO: 441	SEQ ID NO: 443	SEQ ID NO: 445
	VL	DILMTQSPS SLSVSAGE KVTMSCKS SQSLLNSG	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYYYPF T

		NQKNYLA WYQQKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDTFTGSG SGTDFTLTI SSVQAEDL AVYYCQN DYYYPFTF GAGTKLEL			
		SEQ ID NO: 457	SEQ ID NO: 450	SEQ ID NO: 452	SEQ ID NO: 454
Ab23	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCVA SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATLSVVGG NTYYVDSV KGRFTISRD KAKNTLYL QMSSLRSE DTALYYCA RLGQTQRN AMDYWGQ GTSVTVSS	SYTMS	TLSVVGGN TYYVDSVK G	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 466	SEQ ID NO: 459	SEQ ID NO: 461	SEQ ID NO: 463
	VL	DIVMTQSP SSLVSAG EKVTMSCK SSQSLLNS	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYSYPL T

		GNQKNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYSYPLT FGAGTKLE L			
		SEQ ID NO: 475	SEQ ID NO: 468	SEQ ID NO: 470	SEQ ID NO: 472
Ab24	VH	EVKLVESG GGLVKPGG SLKLSCAG SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATITIGVNI YYLDSVKG RFTISRDNA KNTLYLQ MNSLRSED TALYYCTR LGQTQRNA MDYWGQG TSVTVSS	SYTMS	TITIGVNIY YLDSVKG	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 484	SEQ ID NO: 477	SEQ ID NO: 479	SEQ ID NO: 481
	VL	DIVMTQSP TSLSVSAG EKVTMTCK	KSSQSLFNS GNQKNYL A	GASTRES	QNVHFYPF T

		SSQSLFNSG NQKNYLA WYQEKPG QPPKLLIYG ASTRESGV PDRFTGSG SGTDFTLTI SSVQAEDL AVYYCQN VHFYPFTF GAGTKLEL			
		SEQ ID NO: 493	SEQ ID NO: 486	SEQ ID NO: 488	SEQ ID NO: 490
Ab25	VH	EAQLQQSG PELVKPGA SVKIFCKAS GYTFTDYY INWVKQSH GKSLEWIG DINPNNGG TTYNQKFK GKATLTVD KSSSTASM ELRRLTSE DSSVYYCA RRDAMDY WGQGTSV TVSS	DYYIN	DINPNNGG TTYNQKFK G	RDAMDY
		SEQ ID NO: 502	SEQ ID NO: 495	SEQ ID NO: 497	SEQ ID NO: 499
	VL	DIVMTQSQ KFMSTTVG DRVSITCT	TASQNVGP AVA	SASRRFT	QQYISYPLT

		ASQNVGPA VAWYQQK PGQSPKLLI YSASRRFT GVPDRFTG SGSGTVFT LTINNVQS EDLADYFC QQYISYPLT FGAGTKLE LK			
		SEQ ID NO: 511	SEQ ID NO: 504	SEQ ID NO: 506	SEQ ID NO: 508
Ab26	VH	EVMLVESG GGLVKPGG SLKLSCTA SGFTFRSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATITGGGG NTYFLDSV KGRFTFSR DNAKNAL YLQMNSLR SEDALYY CARLGQTQ RNAMDYW GQGTSVTV SS	SYTMS	TITGGGGN TYFLDSVK G	LGQTQRNA MDY
		SEQ ID NO: 520	SEQ ID NO: 513	SEQ ID NO: 515	SEQ ID NO: 517

	VL	DIVMTQSP SSLSVSAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQMNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAIYYCQN DHTYPLTF GAGTKLEL	KSSQSLLN SGNQMN YLA	GASTRES	QNDHTYPL T
		SEQ ID NO: 529	SEQ ID NO: 522	SEQ ID NO: 524	SEQ ID NO: 526
Ab27	VH	QVQLQQSG AELVRPGS SVKISCKAS GYAFS NYWMNWVK QRPGQGLE WIGQIYPG NGDTN YNGKFKGKAT LTADKSST TAYIQLSSL TSEDS AVYFC TRIYYG NSFAYWG QGTLVTVS	NYWMN	QIYPGNGD TNYNGKFK G	IYYGNSFA Y
		SEQ ID NO: 538	SEQ ID NO: 531	SEQ ID NO: 533	SEQ ID NO: 535

	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG ERVMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISRVQAQ DLAVYYC QNDYYYPL TFGAGTKL ELK	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNDYYYPL T
		SEQ ID NO: 547	SEQ ID NO: 540	SEQ ID NO: 542	SEQ ID NO: 544
Ab28	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTSHG VHWVRQP PGKGLEWL GVIWAGGS INFNSALM SRLSISKDN SKNQVFLK MNSLQSDD TAMYYCA RDYYYGIG LDYWGQG TTLTVS	SHGVH	VIWAGGSI NFNSALMS	DYYYGIGL DY

		SEQ ID NO: 556	SEQ ID NO: 549	SEQ ID NO: 551	SEQ ID NO: 553
	VL	DIVMTQSP SSLSVSAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYYYPFT FGSGTKLEI K	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYYYPF T
		SEQ ID NO: 565	SEQ ID NO: 558	SEQ ID NO: 560	SEQ ID NO: 562
Ab29	VH	EVLLQQSG PELVKPGA SVKIPCKAS GYTLTDHS MDWVKQS HGKSLEWI GNILPNNG GNIYNQKF RGKATLTV DKSSSTAY MELRSLTS EDTAVYNC ARGHYGNS	DHSMD	NILPNNGG NIYNQKFR G	GHYGNSFA Y

		FAYWGQG TLVIVS			
		SEQ ID NO: 574	SEQ ID NO: 567	SEQ ID NO: 569	SEQ ID NO: 571
	VL	DIVMTQSP SSLTVRAG EKVTIYCK SSQSLENSG NQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPHRFTGS GSGTDFTL TISSMQAD DLATYYCQ NGYFFPYT FGGGTKLE IK	KSSQSLENS GNQKNYLT	WASTRES	QNGYFFPY T
		SEQ ID NO: 583	SEQ ID NO: 576	SEQ ID NO: 578	SEQ ID NO: 580
Ab30	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLETKFG VNWVRQP PGKGLEWL GAIWGDGS TNYHSALIS RLSINKDN SKSQVFLK LSSLQNVD TATYYCAK	KFGVN	AIWGDGST NYHSALIS	SGYGNAM DY

		SGYGNAM DYWGHGT SVTVSS			
		SEQ ID NO: 592	SEQ ID NO: 585	SEQ ID NO: 587	SEQ ID NO: 589
	VL	DIVMTQSP SSLTVTTG EKVTLNCK SSQSLLNS GNLKNYLT WYQQRPG QPPKLLIY WASTRESG VPYRFTGS GSGTDFTL TISNVQAE DLAIYYCQ NDYFFPFTF GSGTKLEI K	KSSQSLLN SGNLKNYL T	WASTRES	QNDYFFPF T
		SEQ ID NO: 601	SEQ ID NO: 594	SEQ ID NO: 596	SEQ ID NO: 598
Ab31	VH	QIQLAQSG PELKKPGE TVKISCKA SGYSFTNY GMNWVKQ APGKGLK WMGWINT YSGETKYA DDFKGRFD FSLETSART AYLQIKNL	NYGMN	WINTYSGE TKYADDFK G	RDAMDY

		KIEDTATY FCARRDA MDYWGQG TSVTVSS			
		SEQ ID NO: 610	SEQ ID NO: 603	SEQ ID NO: 605	SEQ ID NO: 607
	VL	DIVMTQAA PSVPVTPG ESVSISCRS SKSLLNSN GNTYLYW FLQRPQGS PQLLIYRM SNLASGVP DRFSGSGS GTAFTLRIS RVEAEDVG VYYCMQH LEFPFTFGS GTKLEIK	RSSKSLLNS NGNTYLY	RMSNLAS	MQHLEFPF T
		SEQ ID NO: 619	SEQ ID NO: 612	SEQ ID NO: 614	SEQ ID NO: 616
Ab32	VH	QVQLKESG PGLVAPSQ SLSITCTVS GFSLTSHG VHWVRQP PGKGLEWL GVIWAGGS INFNSALM SRLSISKDN SKNQVFLK MNSLQSDD	SHGVH	VIWAGGSI NFNSALMS	DYYYGIGL DY

		TAMYYCA RDYYYGIG LDYWGQG TTLTVS			
		SEQ ID NO: 628	SEQ ID NO: 621	SEQ ID NO: 623	SEQ ID NO: 625
	VL	DIVMTQSP SSLVSAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYL AWYQQKP GQPPKLLIY GASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISSVQAED LAVYYCQ NDYYYPFT FGSGTKLEI K	KSSQSLLN SGNQKNYL A	GASTRES	QNDYYYPF T
		SEQ ID NO: 637	SEQ ID NO: 630	SEQ ID NO: 632	SEQ ID NO: 634
Ab33	VH	DVNLVESG GGLVKPGG SLKLSCAA SGFTFSSYT MSWVRQT PEKRLEWV ATITYGRIY TYYLDSVK GRFTISRDN AKNTLYLQ	SYTMS	TITYGRIYT YYLDSVKG	MITGNAM DS

		MSSLRSED TAMYYCT RMITGNAM DSWGLGTS VTVSS			
		SEQ ID NO: 646	SEQ ID NO: 639	SEQ ID NO: 641	SEQ ID NO: 643
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG EKVTMSCK SSQSLLNS GNQKNYLT WYQQKPG QPPKLLIY WASTRESG VPDRFTGS GSGTDFTL TISGVQGE DLAVYYC QNDYSYPL TFGGGTKL ELK	KSSQSLLN SGNQKNYL T	WASTRES	QNDYSYPL T
		SEQ ID NO: 655	SEQ ID NO: 648	SEQ ID NO: 650	SEQ ID NO: 652
Ab34	VH	EVLQQSG PELVKPGA SVKIPCKAS GYTFSDYN MDWVKQS HGKSLEWI GHINPNND NTIYNQKF KGKATLTV	SDYNMD	HINPNNDN TIYNQKFK G	GAYYGNS MDY

		DKSSNTAY MDLRSLSS EDTAVYYC ARGAYYG NSMDYWG QGTSVTVS S			
		SEQ ID NO: 664	SEQ ID NO: 657	SEQ ID NO: 659	SEQ ID NO: 661
	VL	DIVMTQSP SSLTVTAG ERVMSCK SSQSLLNG GNQRNYLT WYQQKPG QSPKLLIY WASTWES GVPDRFTG SGSGTDFT LTISSVQAE DLAVYYC QNAYFYYPY TFGGGTKL EIK	KSSQSLLN GGNQRNY LT	WASTWES	QNAYFYYPY T
		SEQ ID NO: 673	SEQ ID NO: 666	SEQ ID NO: 668	SEQ ID NO: 670
Ab35	VH	DVFLQESG PGLVKPSQ SLSLTCTVT GYSITSDY AWNWRQ FPGNKLEW VTYIGYSG	SDYAWN	YIGYSGTTS YNPSLKS	RGSYYGSY WFFDV

		TTSYNPSL KSRISITRD TSKNQFFL QLNSVSTE DTATYYCV RRGSYYGS YWFFDVW GAGTTVTV SS			
		SEQ ID NO: 682	SEQ ID NO: 675	SEQ ID NO: 677	SEQ ID NO: 679
	VL	QVVLSP AILSASPGE KVTMTCR ASSSVSYM HWYQQKP GSSPKPWI YATSNLAS GVPPHFSG SGSGTSYS LTISRVEAE DAATYYC QQWTSNPP TFGGGTKL EIK	RASSSVSY MH	ATSNLAS	QQWTSNPP T
		SEQ ID NO: 691	SEQ ID NO: 684	SEQ ID NO: 686	SEQ ID NO: 688
Ab36	VH	EVKLEESG GGLVQPGG SMKLSCVA SGFTFSNY WMNWVR QSPEKGLE	NYWMN	QIRLKSDN YATHYAES VKG	GGDY

		WVAQIRLK SDNYATHY AESVKGMF TISRDDSKS SVYLQMN NLRAEDTG IYYCTAGG DYWGQGT TLTVSS			
		SEQ ID NO: 161	SEQ ID NO: 693	SEQ ID NO: 695	SEQ ID NO: 697
	VL	DIVMTQSQ KFMSTTVG DRVSITCK ASQNVGTA VAWYHQB PGQSPKLLI YSASNRYT GVPDRFIGS GSGTDFTL TISNVQSED LGNYFCQQ YINYLLTF GSGTKLEI K	KASQNVGT AVA	SASNRYT	QQYINYLL T
		SEQ ID NO: 170	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 167
Ab37	VH	EVKLEESG GGLVQPGG SMKLSCVA SGFTFSNY WMNWVR QYPEQGLE	NYWMN	QIRLNSDN YATHYAES VKG	GGEY

		WVAQIRLN SDNYATHY AESVKGRF TISRDDSR TVYLQMN NLRAEDTG IYYCTGGG EYWGQGT TLTVSS			
		SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO: 172	SEQ ID NO: 174	SEQ ID NO: 176
	VL	DIVMTQSQ KFMSTTIG DRVSITCK ASQNVDTA VAWYQQK PGQSPKLLI YSASTRYT GVPDRFTG SGSGTDFT LTISNMQS EDLADYFC QQYISYQL TFGAGTKL ELK	KASQNVDT AVA	SASTRYT	QQYISYQL T
		SEQ ID NO: 188	SEQ ID NO: 181	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 185
Ab38	VH	QIQLVQSG PELKKPGE TVKISCKA SGYTFTNY GMSWVKQ APGKGLK	NYGMS	WINTYSGV PTYADDFK G	WSGPDPLE DH

		WMGWINT YSGVPTYA DDFKGRFV FSLEASAST AYLQINNL KNEDAATY FCSRWSGP DPLEDHW GQGTTLTV SS			
		SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 194
	VL	QIVLTQSPA IMSASPGE KVTMTCTA SLSLNYIH WYRQRSG TSPKRWIY DTSKLASG VPSRFSGS GSGTSYSL TISSMEAE DAATYYC QQWSSNP WTFGGGT KLEIK	TASLSLNYI H	DTSKLAS	QQWSSNP WT

Также в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты любого из иллюстративных антител к CLDN18, описанные в настоящем документе, например, в таблице 1. Такие функциональные варианты по существу аналогичны иллюстративному антителу как структурно, так и функционально. Функциональный вариант содержит по существу те же VH- и VL-CDR, что и иллюстративное антитело. Например, он может включать только до 3 (например, 2 или 1) вариаций

аминокислотных остатков в общих участках CDR антитела и связывается с одним и тем же эпитопом CLDN18.2 с по существу сходной аффинностью (например, имея среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) в том же порядке). В качестве альтернативы или дополнения варианты аминокислотных остатков представляют собой консервативные замены аминокислотных остатков.

Варианты могут быть получены согласно способам изменения полипептидных последовательностей, известным среднему специалисту в данной области техники, таким как указано в источниках, являющихся сборниками таких методов, например *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, произведенные среди аминокислот внутри следующих групп: (а) М, I, L, V; (б) F, Y, W; (в) К, R, H; (г) А, G; (д) S, T; (е) Q, N и (ж) E, D.

Известно, что CDR отвечают за связывание антигена, однако было обнаружено, что не все из 6 CDR незаменимы или неизменны. Другими словами, можно заменить, изменить или модифицировать один или более CDR в Ab01-Ab38, но при этом по существу сохранить аффинность специфического связывания с CLDN, в частности, с CLDN18.2.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, включают VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 163, 181, 198, 216, 234, 252, 270, 288, 206, 324, 342, 360, 378, 396, 414, 432, 450, 468, 486, 504, 522, 540, 558, 576, 594, 612, 630, 648, 666 и 684, VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 165, 183, 200, 218, 236, 254, 272, 290, 308, 326, 344, 362, 380, 398, 416, 434, 452, 470, 488, 506, 524, 542, 560, 578, 596, 614, 632, 650, 668 и 686, VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из GDY и SEQ ID NO: 22, 40, 58, 94, 112, 130, 148, 167, 185, 202, 220, 238, 256, 274, 292, 310, 328, 346, 364, 382, 400, 418, 436, 454, 472, 490, 508, 526, 544, 562, 580, 598, 616, 634, 652, 670 и 688; и возможно VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 45, 63, 81, 99, 117, 135, 153, 172, 190, 207, 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369, 387, 405, 423, 441, 459, 477, 495, 513, 531, 549, 567, 585, 603, 621, 639, 657, 675 и 693, VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 174, 192, 209, 227, 245, 263, 281, 299, 317, 335, 353, 371, 389, 407, 425, 443, 461, 479, 497, 515, 533, 551, 569, 587, 605, 623, 641, 659, 677 и 695, VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 49, 67, 85, 103, 121, 139, 157, 176, 194, 211, 229, 247, 265, 283, 301, 319, 337, 355, 373, 391, 409, 427, 445, 463, 481, 499, 517, 535, 553, 571, 589, 607, 625, 643, 661, 679 и 697, как показано в таблице 1.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, дополнительно содержат подходящие последовательности каркасных областей (FR), при условии, что указанные антитела могут специфично связываться с CLDN18.2. Последовательности CDR, представленные в таблице 1, получают из мышинового антитела, но они могут быть привиты к любым подходящим последовательностям FR любых подходящих видов, таких как мышь, человек, крыса, кролик, среди прочих, с использованием подходящих методов, известных в данной области, таких как рекомбинантные методики.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, дополнительно содержат один константный домен легкой цепи и/или один или более константных доменов тяжелой цепи. При необходимости описанные в настоящем документе антитела к CLDN18 могут содержать модифицированную константную область. Например, он может содержать модифицированную константную область, которая может усиливать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Активность ADCC можно оценить с использованием

способов, раскрытых в патенте США №5500362. В некоторых воплощениях модифицированная константная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 701-702, как показано в таблице 2, где S122D, A213L и I215E выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности Fc областей.

SEQ ID NO	Название	Аминокислотная последовательность
700	Fc дикого типа тяжелой цепи IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
701	Мутация Fc-DE тяжелой цепи IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGP <u>D</u> VFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

		HQDWLNGKEYKCKVSNKALP APEEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSSFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
702	Мутация Fc-DLE тяжелой цепи IgG1 человека	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALP LPEEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSSFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
703	Fc тяжелой цепи IgG2a мыши	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHP ASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWVFVNNVEVHTAQTQTHR EDYNSTLRVVSALPIQHQQDWM SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI

		SKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTEPVLD SDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKS FSRTPGK
--	--	---

Константные области тяжелой и легкой цепей антител хорошо известны в данной области техники, примерами являются области, которые представлены в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на сайте www.vbase2.org/vbstat.php, оба указанных источника включены в настоящий документ посредством ссылки.

В одном примере описанные в настоящем документе антитела представляют собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам нечеловеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из CDR реципиента заменены остатками из CDR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющие желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасных последовательностях, но включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям

иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все области FR относятся к консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека.

Способы конструирования гуманизированных антител также хорошо известны в данной области (см., например, Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989)). В одном примере переменные области V_H и V_L исходного нечеловеческого антитела подвергают анализу методом трехмерного молекулярного моделирования в соответствии со способами, известными в данной области техники. Затем с использованием того же анализа молекулярного моделирования идентифицируют каркасные аминокислотные остатки, которые, по прогнозам, важны для образования правильных структур CDR. Параллельно цепи V_H и V_L человека, имеющие аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям исходного нечеловеческого антитела, идентифицируют из любой базы данных генов антител с использованием исходных последовательностей V_H и V_L в качестве поисковых запросов. Затем отбирают акцепторные гены V_H и V_L человека.

В другом примере антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой химерное антитело, которое может включать константную область тяжелой цепи или ее часть и/или константную область легкой цепи или ее часть из человеческого антитела. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области первого вида и константную область второго вида. Как правило, в этих химерных антителах переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных от одного вида млекопитающих (например, не являющихся человеком млекопитающих, таких как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых

воплощениях аминокислотные модификации могут быть сделаны в вариательной области и/или константной области.

Термин «chAb01-chAb38», используемый в настоящем документе, относится к химерным антителам на основе Ab01-Ab38, каждое из которых содержит вариательную область тяжелой цепи мыши, представленную в таблице 1, и вариательную область легкой цепи мыши, представленную в таблице 1, слитые соответственно с константной областью тяжелой цепи человека и константной областью легкой цепи человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи человека и константная область легкой цепи человека получены из IgG1 человека. В некоторых воплощениях константная область тяжелой цепи человека и константная область легкой цепи человека получены из IgG1 дикого типа человека, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 700, представленную в таблице 2.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, могут содержать одну или более модификаций или замен в одной или более последовательностях вариательной области, предложенных в настоящем документе, при этом сохраняя аффинность специфического связывания с CLDN18. В некоторых воплощениях по меньшей мере одна (или все) замена (замены) в последовательностях CDR, последовательностях FR или последовательностях вариательной области представляет(ют) собой консервативную замену (замены).

Для достижения этой цели можно использовать различные способы, известные в данной области техники. Например, библиотека вариантов антител (таких как варианты Fab или scFv) может быть создана и экспрессирована с помощью технологии фагового дисплея, а затем проверена на аффинность связывания с CLDN18 человека. В качестве другого примера можно использовать компьютерное программное обеспечение для виртуального моделирования связывания антител с CLDN18 и идентификации аминокислотных остатков на антителах, которые образуют интерфейс связывания. Таких остатков можно либо избегать при замене, чтобы предотвратить снижение аффинности связывания, либо нацеливаться на замену, чтобы обеспечить более сильное связывание.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18 могут содержать CDR тяжелой цепи, последовательность которых по меньшей мере на 80% (например, на 85%, 90%, 95% или 98%) идентична по отдельности или в совокупности VH-CDR иллюстративных антител, описанных в настоящем документе и показанных в таблице 1. В качестве альтернативы или дополнения, антитела к CLDN18 могут содержать CDR легкой цепи, которые имеют по меньшей мере 80%-ную (например, 85%, 90%, 95% или 98%-ную) идентичность последовательностей, по отдельности или в совокупности, с VL-CDR типичных антител, описанных в настоящем документе и показанных в таблице 1.

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, содержат константную область, способную индуцировать эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC. Эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, могут приводить к цитотоксичности по отношению к клеткам, экспрессирующим CLDN18, и могут быть оценены с использованием различных анализов, таких как анализ связывания Fc-рецептора, анализ связывания C1q и анализ лизиса клеток. В некоторых воплощениях константная область относится к изотипу IgG1, который, как известно, индуцирует ADCC.

В некоторых воплощениях антитела против CLDN18 содержат одну или более модификаций в константной области, которые вызывают усиление ADCC. Используемый в настоящем документе термин «усиленная ADCC» определяется как увеличение количества клеток-мишеней, которые лизируются в заданное время, при данной концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, по механизму ADCC, определяемому выше, и/или как снижение концентрации антитела в среде, окружающей клетки-мишени, необходимое для достижения лизиса заданного количества клеток-мишеней в заданное время по механизму ADCC.

Характеристика антител к CLDN18

Связывающая аффинность

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, специфически связываются с CLDN18 человека, CLDN18 мыши и CLDN18

обезьяны Ehesus. В некоторых воплощениях антитела к CLDN18, предложенные в настоящем документе, более специфично связываются с CLDN18.2 человека, CLDN18.2 мыши и CLDN18.2 обезьяны Ehesus, чем с соответствующим CLDN18.1.

В некоторых воплощениях специфическое связывание представленных в настоящем документе антител с CLDN18.2 человека представлено значением «полумаксимальной эффективной концентрации» (EC_{50}), которое относится к концентрации антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта (например, связывания). Значение EC_{50} можно измерить способами, известными в данной области, например с помощью сэндвич-анализа, такого как ELISA, вестерн-блоттинг, анализ проточной цитометрией и другие анализы связывания. В некоторых воплощениях антитела, предложенные в настоящем документе, специфично связываются с CLDN18.2 человека при EC_{50} (т.е. концентрация 50% связывания) не более 6 нМ, не более 5 нМ, не более 4 нМ, не более 3 нМ, не более 2 нМ, не более 1,5 нМ, не более 1 нМ, не более 0,9 нМ, не более 0,8 нМ, не более 0,7 нМ, не более 0,6 нМ, не более 0,5 нМ, не более 0,4 нМ, не более 0,3 нМ, не более 0,2 нМ или не более 0,1 нМ по данным, полученным с помощью FACS.

В некоторых воплощениях специфичное связывание антител с CLDN18.2 человека представлено средней интенсивностью флуоресценции (MFI) или максимальной MFI (MAX MFI), измеренной с помощью FACS. Более высокий показатель MAX MFI указывает на более высокую аффинность связывания, когда условия измерения остаются одинаковыми для разных образцов. Различия в аффинности связывания (например, для специфичности или других сравнений) могут составлять по меньшей мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или 10^5 раз.

В некоторых воплощениях антитела, предложенные в настоящем документе, имеют аффинность специфичного связывания с CLDN18.2 человека, которая достаточна для обеспечения диагностического и/или терапевтического применения. В некоторых воплощениях антитела, предложенные в настоящем документе, имеют аффинность

специфичного связывания с CLDN18.2 человека, экспрессия которого слишком низка, чтобы специфично связываться с существующими антителами к CLDN18.2, такими как IMAВ362. В некоторых воплощениях антитела, предложенные в настоящем документе, специфично связываются с клетками с низкой экспрессией CLDN18.2, имеющими менее 10000 сайтов связывания антитела к CLDN18.2 на клетку, менее 9000 сайтов связывания антитела к CLDN18.2 на клетку, менее 8000 сайтов связывания антитела к CLDN18.2 на клетку, менее 7000 сайтов связывания антител к CLDN18.2 на клетку, менее 6000 сайтов связывания антител к CLDN18.2 на клетку, или менее 5000 сайтов связывания антител к CLDN18.2 на клетку или менее 4000 сайтов связывания антитела против CLDN18.2 на клетку.

ADCC

Чтобы оценить ADCC-активность интересующей молекулы, может быть проведен анализ ADCC *in vitro*, такой как описано в патенте США №5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) и Hellstrom et al, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); патенте США №5821337; или Bruggemann et al, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). В качестве альтернативы можно использовать методы нерадиоактивных анализов (см., например, анализ нерадиоактивной цитотоксичности АСТИ™ для проточной цитометрии (Cell Technology Inc., Маунтин-Вью, Калифорния) и анализ нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Мэдисон, Висконсин)). Кроме того, ADCC-активность интересующей молекулы может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как модель, описанная Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

ADCC-активность антитела может быть усилена с помощью конструирования гликозилированных форм антитела. Сообщалось, что ряд форм гликозилирования усиливает ADCC-активность антитела за счет усиления его связывания с Fc-рецептором эффекторных клеток. Различные формы гликозилирования включают любую из нескольких форм гликанов, присоединенных к антителу, с различными сахарами (например, отсутствие одного типа сахара, такого как фукоза, или наличие высокого

уровня одного типа сахара, такого как манноза), или формы, имеющие различную структуру (например, различную разветвленную структуру, такую как биантенная (две ветви), триантенная (три ветви) или тетраантенная (четыре ветви) структуры).

В некоторых воплощениях антитела против CLDN18, предложенные в настоящем документе, являются гликоинженерными. «Гликоинженерное» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь повышенный или пониженный уровень гликозилирования, изменение формы гликозилирования или и то, и другое по сравнению с его аналогом, полученным не с помощью гликоинженерии. В некоторых воплощениях гликоинженерные антитела проявляют повышенную ADCC-активность относительно их неинженерных аналогов. В некоторых воплощениях повышенная активность ADCC характеризуется по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 65%, 70% или 75% более высоким лизисом клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Антитела могут быть гликоконструированы способами, известными в данной области, включая любые манипуляции с пептидным остовом (например, модификации аминокислотной последовательности и/или группы боковой цепи отдельных аминокислот) и/или манипуляции с посттрансляционными модификациями через линию клеток-хозяев (например, модификации паттерна гликозилирования). Способы изменения активности ADCC путем инженерии гликозилирования антитела также описаны в данной области, см., например, Weikert et al. (1999) *Nature Biotech.*, 17:116-121; Shields R. L. et al. (2002), *J. Biol. Chem.*, 277: 26733-26740; Shinkawa et al. (2003), *J Biol Chem.*, 278, 3466-3473; Ferrara et al. (2006), *Biotech. Bioeng.*, 93, 851-861; Yamane-Ohnuki et al.(2004), *Biotech Bioeng.*, 87, 614-622; Niwa et al.(2006), *J Immunol Methods* 306, 151-160; Shinkawa T. et al, *J. Biol. Chem.*, (2003), 278: 3466-3473.

В некоторых воплощениях гликоинженерные антитела, предложенные в настоящем документе, являются афукозилированными (т.е. не содержат фукозы). Несколько исследований показали, что афукозилированные (то есть дефицитные по фукозе или нефукозилированные) антитела демонстрируют повышенное связывание с CLDN18.2 и, таким образом, вызывают более высокую ADCC-активность (Shields et al.

(2002) J. Biol. Chem., 277:26733-26740; Shinkawa et al. (2003) J. Biol. Chem., 278:3466-3473; и публикация заявки на европейский патент № 1176195). В некоторых воплощениях афукозилированное антитело, предложенное в настоящем документе, не содержит фукозы в положении аспарагина 297 (Asn297) тяжелой цепи (на основе нумерации по Kabat). Asn297 представляет собой консервативный N-связанный сайт гликозилирования, обнаруживаемый в каждом домене CH2 Fc-области изотипа IgG1 антител (Arnold et al., *Glycobiology and Medicine*, 564:27-43, 2005).

В некоторых воплощениях гликоинженерные антитела, предложенные в настоящем документе, характеризуются формой с высоким уровнем маннозного гликозилирования (например, манноза e5, манноза 7, 8, 9 гликан). Было доказано, что форма с высоким содержанием маннозного гликозилирования повышает активность ADCC (Yu et al. (2012), *Landes Bioscience, mAbs* 4:4, 475-487).

В некоторых воплощениях антитело, предложенное в настоящем документе, дополнительно содержит в своей константной области одну или более модификаций, которые: а) вводят или удаляют сайт гликозилирования, б) вводят свободный остаток цистеина, в) усиливают связывание с активирующим Fc-рецептором и/или г) усиливают ADCC.

Антигенсвязывающие фрагменты

Настоящее изобретение также обеспечивает антигенсвязывающие фрагменты, которые могут специфически связываться с CLDN18. Различные типы антигенсвязывающих фрагментов известны в данной области и могут быть разработаны на основе антител к CLDN18, представленных в настоящем документе, включая, например, иллюстративные антитела, CDR и переменные последовательности которых показаны в таблице 1, и их различные варианты, содержащие модификации или замены.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент против CLDN18, представленный в настоящем документе, представляет собой камелизированное однодоменное антитело, диатело, одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), димер scFv, dsFv,

(dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv-фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, ds-диатело, наноантитело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

Для получения таких антигенсвязывающих фрагментов можно использовать различные методики. Иллюстративные способы включают ферментативное расщепление интактных антител (см., например, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) и Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)), рекомбинантную экспрессию клетками-хозяевами, такими как *E. coli* (например, для фрагментов антител Fab, Fv и ScFv), скрининг из библиотеки фагового дисплея, как обсуждалось выше (например, для ScFv), и химическое связывание двух фрагментов Fab'-SH с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Специалисту в данной области техники будут очевидны и другие способы получения фрагментов антител.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv. Получение scFv описано, например, в WO 93/16185; патентах США №5571894 и 5587458. ScFv может быть слит с эффекторным белком либо на amino-, либо на карбоксильном конце, с получением слитого белка (см., например, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck).

Конъюгаты

В некоторых воплощениях антитела к CLDN18 дополнительно содержат конъюгатный фрагмент. Конъюгатный фрагмент может быть связан с антителом, предложенным в настоящем документе. Конъюгатный фрагмент представляет собой небелковый или пептидный фрагмент, который может быть присоединен к антителу. Предполагается, что различные части конъюгата могут быть связаны с представленными в настоящем документе антителами (см., например, "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Фрагмент конъюгата может быть связан с антителом, в числе прочих способов, посредством ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции,

координационного связывания, комплексообразования, ассоциации, смешивания или добавления.

В некоторых воплощениях антитела против CLDN18 связаны с одним или более конъюгатами через линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой гидразиновый линкер, дисульфидный линкер, бифункциональный линкер, дипептидный линкер, глюкуронидный линкер или тиоэфирный линкер. В некоторых воплощениях линкер представляет собой расщепляемый лизосомами дипептид, например, валин-цитруллин (vc).

Конъюгатный фрагмент может представлять собой терапевтический агент (например, цитотоксический агент), радиоактивный изотоп, детектируемую метку (например, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку или фермент-субстратную метку), фармакокинетический модифицирующий фрагмент или очищающий компонент (такой как магнитный шарик или наночастица).

Примеры детектируемой метки могут включать флуоресцентную метку (например, флуоресцеин, родамин, дансил, фикоэритрин или техасский красный), фермент-субстратную метку (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазы, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы или β -D-галактозидазу), радиоизотоп, люминесцентную метку, хромофорный фрагмент, дигоксигенин, биотин/авидин, молекулу ДНК или золото для детектирования.

Примеры радиоизотопов могут включать ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P и другие лантаноиды. Меченные радиоизотопом антитела пригодны для применения в экспериментах по визуализации, ориентированных на рецепторы.

В некоторых воплощениях модифицирующая фармакокинетику часть может представлять собой агент, модифицирующий клиренс, который способствует увеличению времени полужизни антитела. Иллюстративные примеры включают водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры

этиленгликоля/пропиленгликоля и т.п. Полимеры могут иметь любую молекулярную массу и могут быть разветвленными или неразветвленными. Количество полимеров, присоединенных к антителу, может варьировать и, если присоединено более одного полимера, они могут представлять собой одинаковые или разные молекулы.

В некоторых вариантах реализации конъюгатный фрагмент может представлять собой очищающий фрагмент, такой как магнитные шарики или наночастицы.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В некоторых воплощениях конъюгаты, предложенные в настоящем документе, представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие любое из указанных выше антител к CLDN18, конъюгированное с цитотоксическим агентом. Другими словами, фрагмент конъюгата содержит цитотоксический агент.

ADC могут быть применены для местной доставки цитотоксического агента, например, при лечении рака. Это позволяет целенаправленно доставлять цитотоксические агенты к опухолям и накапливать их внутри клеток, что особенно ценно, когда системное введение этих неконъюгированных цитотоксических агентов может привести к неприемлемым уровням токсичности нормальных клеток, а также опухолевых клеток, которые необходимо уничтожить (Baldwin et al., (1986), *Lancet*, 603-05; Thorpe, (1985), *Monoclonal Antibodies*, 84; Pinchera et al. (ed.s), *Biological And Clinical Applications*, 475-506; Syrigos and Epenetos (1999), *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; и патент США №4975278).

«Цитотоксический агент» может представлять собой любой агент, который губителен для раковых клеток или который может повреждать или уничтожать раковые клетки. В некоторых воплощениях цитотоксический агент необязательно представляет собой химиотерапевтический агент (такой как агент, подавляющий рост, ДНК-алкилаторы, ингибитор топоизомеразы, тубулин-связывающие средства или другие противораковые лекарственные средства), токсин или высокореактивный радиоактивный изотоп.

Примеры цитотоксического агента включают крупномолекулярные бактериальные токсины и растительные токсины, такие как, например, дифтерийный токсин, экзотоксин А-цепи (из *Pseudomonas aeruginosa*), рицин, абрин, модекцин, альфасарцин, *Aleurites fordii* (тунг Форда), белки, диантиновые белки, белки *Phytolacca americana* (PARI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены (см., например, WO 93/21232). Такой крупномолекулярный токсин может быть конъюгирован с антителами, представленными в настоящем документе, с использованием способов, известных в данной области, например, как описано в Vitetta et al (1987) Science, 238:1098.

Цитотоксический агент может также представлять собой низкомолекулярные токсины и химиотерапевтические препараты, такие как гелданамицин (Mandler et al (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), майтанзиноиды (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), калихеамицин (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, виндезин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиаминплатину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин), калихеамицин, майтансиноиды, доластатины, ауристатины (такие как

монометилауристатин Е (ММАЕ) и монометилауристатин F (ММАF)), трихотецен и СС1065 и их производные, обладающие цитотоксической активностью. Такой токсин может быть конъюгирован с представленными в настоящем документе антителами с использованием способов, известных в данной области, например, как описано в патенте США №7964566; Kline, T. et al, *Pharmaceutical Research*, 32(11): 3480-3493.

Цитотоксический агент также может представлять собой высокорadioактивный изотоп. Примеры включают At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} и радиоактивные изотопы Lu. Способы конъюгации радиоизотопа с антителом известны в данной области, например, с помощью подходящего лигандного реагента (см., например, WO94/11026; *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)). Реагент-лиганд имеет хелатирующий лиганд, который может связывать, хелатировать или иным образом образовывать комплексы с радиоактивным изотопом металла, а также имеет функциональную группу, которая вступает в реакцию с тиолом цистеина антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Примеры хелатирующих лигандов включают DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.).

В некоторых воплощениях антитела присоединены к фрагменту конъюгата через линкер, например, гидразиновый линкер, дисульфидный линкер, бифункциональный линкер, дипептидный линкер, глюкуроновый линкер или тиоэфирный линкер.

Примеры бифункциональных линкеров включают, например, N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиоланы (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-дiazония (такие как бис-(п-diazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и биактивные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол).

В некоторых воплощениях линкер расщепляется в определенных физиологических условиях, тем самым облегчая высвобождение цитотоксического агента в клетке. Например, линкер может представлять собой кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазе линкер, фотолабильный линкер, диметиллинкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); патент США № 5,208,020). В некоторых воплощениях линкер может содержать аминокислотные остатки, такие как дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Аминокислотные остатки в линкере могут быть природными или неприродными аминокислотными остатками. Примеры таких линкеров включают: валин-цитруллин (ve или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe), глицин-валин-цитруллин (gly-yl-cit), глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly), валин-цитруллин-п-аминобензилоксикаронил («vc-PAB»). Аминокислотные линкерные компоненты могут быть разработаны и оптимизированы по их селективности в отношении ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином В, С и D или плазминовой протеазой.

ADC, предложенные в настоящем документе, могут быть получены любыми подходящими способами, известными в данной области техники. В некоторых воплощениях нуклеофильная группа антитела сначала реагирует с бифункциональным линкерным реагентом, а затем связывается с цитотоксическим агентом или наоборот, т.е. сначала нуклеофильная группа цитотоксического агента реагирует с бифункциональным линкером, а затем связывается с антителом.

В некоторых воплощениях цитотоксический агент может содержать (или быть модифицированным, чтобы содержать) реакционноспособную тиольную функциональную группу, которая может реагировать с тиолом цистеина свободного цистеина антител, представленных в настоящем документе. Иллюстративные тиол-реактивные функциональные группы включают, например, малеимид, иодацетамид, пиридилдисульфид, галогенацетил, сукцинимидиловый эфир (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиоцианат, сульфонилхлорид, 2,6-дихлортриазинил,

пентафторфениловый эфир или фосфорамидит (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. in *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671).

Цитотоксический агент или антитело могут реагировать со связывающим реагентом перед конъюгированием с образованием ADC. Например, N-гидроксисукцинимидиловый эфир (NHS) цитотоксического агента может быть получен, выделен, очищен и/или охарактеризован, или он может быть образован *in situ* и прореагировать с нуклеофильной группой антитела.

В некоторых воплощениях цитотоксический агент и антитело могут быть связаны путем активации *in situ* и реакции с образованием ADC в одну стадию. В другом примере антитело может быть конъюгировано с биотином, а затем непрямым образом конъюгировано со вторым конъюгатом, который конъюгирован с авидином.

В некоторых воплощениях фрагмент конъюгата случайным образом присоединен к определенному типу экспонированных на поверхности аминокислотных остатков в антителе, например, остатку цистеина или остатку лизина.

В некоторых воплощениях фрагмент конъюгата присоединен к специально определенному сайту, чтобы обеспечить популяции ADC с высокой гомогенностью и согласованностью между партиями в отношении соотношения лекарственное средство/антитело (DAR) и сайта присоединения. В некоторых воплощениях фрагмент конъюгата присоединен к определенным сайтам в молекулах антител с помощью природных аминокислот, неприродных аминокислот, коротких пептидных меток или гликанов Asn297. Например, конъюгация может быть в конкретном сайте за пределами участка, связывающего эпитоп.

Сайт-специфическое присоединение может быть обеспечено путем замены нативной аминокислоты в определенном участке антитела аминокислотой, такой как цистеин, с которой может быть конъюгирована молекула лекарственного средства, или

введения до/после определенного участка антитела (см. Stimmel et al. (2000), JBC, 275(39):30445-30450; Junutula et al. (2008), Nature Biotechnology, 26(8):925-932, и WO2006/065533). В качестве альтернативы, сайт-специфическая конъюгация может быть обеспечена путем конструирования антител, содержащих неприродные аминокислоты (например, п-ацетилфенилаланин (pAcF), N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин, п-азидометил-L-фенилаланин (pAMF) и селеноцистеин (Sec)) в определенных участках их тяжелых и/или легких цепей, как описано в Axup et al. ((2012), Proc Natl Acad Sci USA. 109(40):16101-16116), где неприродные аминокислоты обеспечивают дополнительное преимущество, заключающееся в том, что можно разработать ортогональную химию для связывания линкерного реагента и лекарственного средства. Иллюстративные специфические сайты (например, легкая цепь V205, тяжелая цепь A114, S239, H274, Q295, S396 и т.д.), применимые в двух вышеописанных сайт-специфических способах конъюгации, описаны во многих предшествующих областях техники, например, Strop et al. (2013), Chemistry & Biology, 20, 161-167; Qun Zhou (2017), Biomedicines, 5, 64; Dimasi et al. (2017), Mol. Pharm., 14, 1501–1516; WO2013/093809 и WO2011/005481. Другим сайт-специфическим методом конъюгации ADC является гликан-опосредованная конъюгация, при которой лекарственное средство-линкер может быть конъюгировано с гликанами Asn297 (такими как фукоза, галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, сиаловая кислота), расположенными в домене CH2, вместо связывания с относительно гидрофобным цитотоксическим агентом в аминокислотный остов антитела. Были также предприняты попытки ввести уникальные короткие пептидные метки (такие как LLQG, LPETG, LCxPxR) в антитела через специфические сайты (например, сайты в N-концевых или C-концевых участках), которые затем позволяют вводить определенные аминокислоты в пептидные метки для функционализации и связи с лекарственными линкерами (Strop et al. (2013), Chemistry & Biology, 20, 161-167; Beerli et al. (2015), PLoS ONE, 10, e0131177; Wu et al. (2009), Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 3000–3005; Rabuka (2012), Nat. Protoc. 7, 1052–1067).

Полинуклеотиды и рекомбинантные методы

В настоящем изобретении предложены выделенные полинуклеотиды, которые кодируют предложенные в настоящем документе антитела к CLDN18.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем документе, относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Если специально не ограничено, данный термин охватывает полинуклеотиды, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают такими же связывающими свойствами, что и референсная нуклеиновая кислота, и метаболизируются способом, сходным с встречающимися в природе нуклеотидами. Если не указано иное, конкретная полинуклеотидная последовательность также неявно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP (однонуклеотидные полиморфизмы) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно получить путем создания последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменено остатками смешанного основания и/или дезоксиинозина (см. Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

В некоторых воплощениях выделенные полинуклеотиды содержат одну или более нуклеотидных последовательностей, представленных в таблице 3, и/или их гомологичную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%-ную (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%-ную) идентичность последовательности и/или их варианта, имеющего только вырожденные замены, и кодирует вариabельную область типичных антител, представленных в настоящем документе. ДНК, кодирующую моноклональное антитело, легко выделяют и секвенируют с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами,

кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Кодированная ДНК также может быть получена синтетическими методами.

Таблица 3. Полинуклеотиды варибельных областей иллюстративных антител

Идентификационный номер антитела	Варибельная цепь	Полинуклеотид каждой варибельной цепи
		SEQ ID NO: 24
Ab01	VH	GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGT GAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTC ACCTGCTCTGTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGT TATTACTGGAACCTGGATCCGGCAG TTTCCAGGAAACAAATTGGAATGGATGGGCTACAT AACCTACGATGGTAGCAATAACTAC AACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACTCGT GACACATCTAAGAACCAGTTTTTC CTGAAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACGCAGC CACATATTTCTGTGCAAGAGATCCA AATTACTACGGTACTACCCTACCGGCCTGGTTTGT TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 33
	VL	GACATTGTGGTGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCC ACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGC TGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA GGGCAATCTCCTAAATTACTGATTTACTGGGCATCC ACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC TCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT

		GAAGACTTGACAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGC AGCTATGTCACGTTTCGGTGCTGGG ACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 42
Ab02	VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATC ACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAAACCAGCTAT GCTATAAACTGGGTTTCGCCAGCCA CCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGGAGTAATTTG GACTGGTGGAGGCACAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAACAAAGA CAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAG GTACTACTGTGCCCCGATTCTATGAT GGTTACTACTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGG ACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 51
	VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCC ACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGC TGTAACCTGGTATCAACAGAAACCA GGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCC ACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTAC TCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAACAATATAGT AGCTATCCATTACGTTTCGGCTCG GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
		SEQ ID NO: 60

Ab03	VH	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA GCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTGACTAC AACATGGACTGGGTGAAGCAGAGC CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAA TTCTTATTATGGTGGTACTATCTAT AATCAGAAATTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGT AGACAAGTCTTCCAGCACAGCCTAC ATGGTCCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACAATGC AGTCTATTACTGTGCAAGACCCAC TTGGGGAATGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAAC CTCAATCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 69
	VL	GACATTGTGGTGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACACCAGGAGAAAAGGTCCT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAACAG TGGAAATCAAAGAAGTACTTGTCC TGGTACCAGCAGAACCCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG CAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGA TCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGGTTA TTACTGTCAGAATGATTATATTTTT CCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 78
Ab04	VH	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG TCCTGCATGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTGACTAC AACATACACTGGGTGAAGCGGAGC CATGGATCCCGTCTTGAGTGGATTGGATATATTAGT CCTATCAGTGGTGGTGCTGGCTAC

		AACCAGAAAGTTCATGGACAAGGCCACATTGACTGT AGACAAGTCCTCCAACACAGCCTAC ATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGC AGTCTATTACTGTACAAGAGGGGAC TACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 87
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCT GTGACAGTAGGAGAGAAGGTCCT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGACC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAATT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG AAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGGAATTTA TTACTGTCTGAATGATTATGGTTTT CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGTCCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 96
Ab05	VH	GACGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGAAGACTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCTGCCTCTGGGTTCACCTTCAGTAACTAT GCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCATATGTTAG TAGTGGTGGTGATTACATCTACTAT GCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAG AGACAATGCCAGGAACACCCTGTAC CTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGC CATGTATTACTGTGCAAGAGTCTAC TTTGGTAACTCCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC ACTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 105

	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACT CTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTCTTAAATGGT GGAAATCAAAAGAACTACTTGACC TGGTACCAGCAGAGACCAGGACAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCATC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGATTATTATTAT CCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT CAAA
		SEQ ID NO: 114
Ab06	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACTTTCAGAAGTTAT GCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAAAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAC TGATGGTGGTAGTTACATCTTCTAT CCAGACAATGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCGG AGACCATGCCAAGAACAACCTGTAC CTGCAAATGAGCCATCTGAAGTCTGAGGACACAGC CTTGTATTTCTGTGTAAGACTCTAC TATGGAAACTCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 123
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACT TTGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGT GGAAATCAAAAGAACTACTTGACC TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG

		GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC TTCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGCTTATATTTAT CCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAATTGGAAAT AAAA
		SEQ ID NO: 132
Ab07	VH	GAGG TTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATA TCCTGCAAGGCTTCTGGT TACTCATTTACTGACTAC TTTATGAACTGGGTGAAGCAGAGC CATGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAA TCCTTACAATGGTGATACTTTCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGT AGACAAATCCTCTAGCACAGCCCAC ATGGAGCTCCTGAGCCTGACATCTGAGGACTTTGC AGTCTATTATTGTGCCCTCTATGAT GGTTACTGGGGGGCTTTTGTTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 141
	VL	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCT GTATTTGTGGGAGAACTGTCACC ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAA TTAGCATGGTATCAGCAGAAACAG GGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGCTGCAACA AACTTAGCAGATGGTGTGCCATCA AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTC CCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCT GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGG GGTACTCCGCTCACGTTTCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 150

Ab08	VH	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGTTGGT AAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTG TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACCAGCTAC TTACTACACTGGGTGAAACAGAGG CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAATGATTCA TCCTAATGGTGGTAGTACTAATACTAC AATGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGC GGTCTATTACTGTGCCCCTGTCTAC TTTGGTAACTCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 159
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCCT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGACC TGGTACCAGCAAAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TACTGTCAGAATGATTATTATTAT CCATTCACGTTTCGGTTCGGGGACAAAGTTGGAAAA AAAA
		SEQ ID NO: 204
Ab09	VH	GAGGTCCAAGTGCACAGTCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATG TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTAC AACATGCACTGGGTGAAACTGAGC CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAA CCCTAATAATGGGGGTACTATCTAC

		AACCAGCGATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGT AAACAAGTCCTCCAGAACAGCCTAC ATGGACCTCCGCAGCCTGACATCGGAGGATTCTGC AGTCTATTACTGTGCGCGACAGGGT TACTACGGTAACTCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AAATTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 213
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACACCAGGAGAGAGGGTCACT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACGG TGGAAATCAAAGGAACTACTTGACC TGGTACCAGCAAAAACCAGGGCAGCCTCCTAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCGCAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGAGTGCAGGCTGAAGACCTGTCATTTTA TTACTGTCAGAATTCTTATTTTTAT CCGTTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGACCT AAGA
		SEQ ID NO: 222
Ab10	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAG TGTTATTGGTGGTAACACCTACTAT GTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAG AGACAAAGCCAAGAACACCCTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGC CTTATATTACTGTGCAAGACTGGGA CAGACACAGAGAAATGCTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

		SEQ ID NO: 231
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCTCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACA ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCC TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAACT GTTGATCTACGGGGCATCTACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 240
Ab11	VH	GAAGTGATGTTGGTGGAAATCTGGGGGAGACTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTCGTTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCGTTAG TGTTGGTTCTGGTAACACCTACTAT TTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAACACCCTGTTC CTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGC CTTATATTACTGTACAAGACTGGGA CAGACACAGAGAAATGCTGTGGACTACTGGGGTCA AGGCACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 249
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCTGAGT GTGTCAGCGGGAGAGAAGGTCACT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTCAACGG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCC TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAACT

		GTTGATCTACGGGGCATCCACTAGG GACTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC ATCAGCAATGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTA TTTCTGTCAGAATGATCATA
		SEQ ID NO: 258
Ab12	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAT TGGTGGTTATGGTAACACCTACTAT GCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAG AGACAGTGCCAAGAACACCCTGTAC CTACAAATGCTCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGC CTTGTATTACTGTACAAGACTGGGA CAGACACAGAGAAATGCTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 267
	VL	GACATTTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAATCAAAGGAAGTATTTGGCC TGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAATT GTTGATCTATGGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTATTGTCAGAATGATTATTATTAT CCACTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 276

Ab13	VH	GAAGTGAGGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAC TATTGGTGTTAACATCTACTATCTA GACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGA CAATGCCAAGAACACCCTGTACCTG CAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTT GTATTATTGTACAAGACTGGGACAG ACACAGCGAAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 285
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCAACCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCT ATGACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTATTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCC TGGTACCAGGAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACGGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACCGATTTCCTCTTACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TACTGTCAGAATAATCATTTTTAT CCGCTCACTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAC GAAA
		SEQ ID NO: 294
Ab14	VH	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGTTGGT AAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTG TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACCAGCTAC TACTACACTGGGTGAAACAGAGG CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAATGATTCA TCCTAATGGTGGTAGTACTAAGTAC

		AATGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGC GGTCTATTACTGTGCCCCTGTCTAC TTTGGTAACTCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 303
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACT ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGACC TGGTACCAGCAAAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGATTATTATTAT CCATTCACGTTTCGGTTCGGGGACAAAGTTGGAAAA AAAA
		SEQ ID NO: 312
Ab15	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTGT TGGTGGTGGTGGTTACACCTACTAT CTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAACACCCTGTAC CTGCAAATGATCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGC CTTATATTACTGTGCAAGAATGGGA CTGACACAGAGAAATGCTCTGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAATCACCGTCTCCTCA

		SEQ ID NO: 321
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGAAGGAGAGAAGGTCACT CTGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCC TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTAATCTACGGGGCATCCACTAGA GAATCTGGGGTCCCTGATCGTTTCACAGGCAGTGG ATTTGGCACCGATTTCACTCTTACC ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGATCATACTTAT CCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGGCCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 330
Ab16	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAATAGTTAT ACCATGTCTTGGGTTCGCCAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAC TGTTATTGGTGGTAACACCTACTAT TTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCAACATTTCCATA GACAATGGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGC CTTGTATTACTGTGCAAGAATGGGA CAGACACAGAGAAATGCTATGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 339
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGACAGAAGGTCACT ATGAGGTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCC TGGTATCAGCAGAACTAGGGCAGCCTCCTAAACT

		ACTGATCTACGGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGTGG ATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC ATCACCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATGATTATAGTTTT CCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCT GAAA
		SEQ ID NO: 348
Ab17	VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATC ACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTAACCAGCTAT GCTATAAGCTGGGTTCCGCCAGCCA CCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGGAGAAATATG GACTGGTGGAGGCACAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAAGA CAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTA AAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCAG GTACTACTGTGGCAGACTTTCCTAT GGTAATTCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCAC TCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 357
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCCT ATGAGTTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAG TGGAAATCAAAGAAGTACTTGACC TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACT GTTGATCTACTGGGCATCCACTAGG GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGG ATCTGGAACAGATTTCACTCTCACC GTCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGAATAATTTTATTAT

		CCTCTCACGTTTCGGTCCTGGGACCAAGCTGGAGTTG AAA
		SEQ ID NO: 366
Ab18	VH	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGT CTCAGGGTTCTCATTAACCACCTATGGTATAAACTG GGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC TGGGAGTCATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CATTCAGCTCTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAA GGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAACTGA ACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCACGTACTAC TGTGTCAAATCCTCTTACTACGGTAATGCTATGGAC TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 375
	VL	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGACGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGTTTATAGTTATCCATTCACGTTTCGGCTCGGG GACAAAGTTGGAAATAAAA
		SEQ ID NO: 384
Ab19	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCAGTTTCAGTCGCTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCAACCGTTAGTGTTGGTTCTGGTAACACCTAC TATTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCC

		AGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTTCTTGCAAAT GAGTAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTATATT ACTGTGCAAGAATGGGACAGACACAGAGAAATGCT GTGGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCACCGT CTCCTCA
		SEQ ID NO: 393
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCTTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGTGGAATCAAA AGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAGCTGTTGATCTACGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAA TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATCTCTGTCA GAATGATCATAGTTTTCCGCTGACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAGA
		SEQ ID NO: 402
Ab20	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGTAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGTTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCAACCATTATTGGTGGTTATGGTAACACCTAC TATTCAGACAGTGTGAAGGGTCGAATCACCATCTC CAGAGACAGCGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAA TGATCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATT ACTGTACAAGACTGGGACAGACACAGAGAAATGCT ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCA
		SEQ ID NO: 411
	VL	GACATTTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAACTGCAA

		GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGATTATTATTATCCATTCACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 420
Ab21	VH	GAAGTGATGCTGGTGAATCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGACTGGAGTGG GTCGCAACCATTATTGGTGGTTATGGTAACACCTAC TATGTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCC AGAGACAGTGCCAAGAACACCCTCTACCTACAAAT GATCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATT ACTGTACAAGACTGGGACAGACACAGAGAAATGCT ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCA
		SEQ ID NO: 429
	VL	GACATTTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAATTATTGATCTATGGGGCATCTACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTATTGTCA GAATGATTATTATTATCCGTTACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 438

Ab22	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCAACCATTATTGGTGGTTATGGTAACACCTAC TATGCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTC CAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAA TGATCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATT ACTGTACAAGACTGGGACAGACACAGAGAAATGCT ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCA
		SEQ ID NO: 447
	VL	GACATTTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATACCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGATTATTATTATCCGTTACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAG
		SEQ ID NO: 456
Ab23	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGTAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCAACCCTTAGTGTGTTGGTGGTAACACCTAC TATGTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCC AGAGACAAAGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAAT GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTATATT ACTGTGCAAGACTGGGACAGACACAGAGAAATGCT

		ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 465
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCTCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACAATGAGTTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCTACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGTAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 474
Ab24	VH	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGGCTCTGGATTCACTTTCACTAGCTATAACCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGTCGCAACCATTACTATTGGTGTTAACATCTACTATCTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCTTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTACAAGACTGGGACAGACACAGCGAAATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCA
		SEQ ID NO: 483
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCAACCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCATGACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTATCAGGAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACT

		AGGGAGTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCCGTTTATTACTGTCA GAATGTTCATTTTTATCCGTTACGTTCCGGTGCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 492
Ab25	VH	GAGGCCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCGTCAGTGAAGATATTCTGTAAGG CTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATCAACT GGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTACC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGAC TGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTCCATGGAGC TCCGCAGACTGACATCTGAAGACTCTTCAGTCTATT ACTGTGCAAGACGCGATGCTATGGACTACTGGGGT CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 501
	VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCC ACAACAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAC GGCCAGTCAGAATGTGGGTCCTGCTGTTGCCTGGTA TCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGA TTTACTCAGCATCCCGTCGGTTCCTGGAGTCCCTG ATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGTTTCA CTCTCACCATTAAACAATGTGCAGTCTGAAGACCTGG CAGATTATTTCTGTGTCAGCAATATATCAGCTATCCTC TCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 510
Ab26	VH	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTACAG CCTCTGGATTCACTTTCAGAAGCTATAACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG

		GTCGCAACTATTACTGGTGGTGGTGGAAATACCTA CTTTCTAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCTTCTC CAGAGACAATGCCAAGAACGCCCTGTACCTGCAAA TGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTAT TACTGTGCAAGACTGGGACAGACACAGAGAAATGC TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG TCTCCTCA
		SEQ ID NO: 519
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCCGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTATTAAACAGTGGAAATCAAA TGAACACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGA CAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTACTGTCA GAATGATCATACTTATCCGCTCACGTTCCGGTGCTGG GACCAAACCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 528
Ab27	VH	CAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGT GAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGG CTTCTGGCTATGCATTCAGTAACTACTGGATGAACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGG ATTGGACAGATTTATCCTGGAAATGGTGATACTAA CTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGA CTGCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATTCAG CTCAGCAGCCTAACTTCTGAGGACTCTGCGGTCTAT TTCTGTACAAGGATCTACTATGGTAACTCTTTTGCT TACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
		SEQ ID NO: 537

	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAGGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACAGATTTACCCTCACCATCAGCA GGGTGCAGGCTCAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTC AGAATGATTATTATTATCCACTCACGTTCCGGTGCTG GGACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 546
Ab28	VH	CAGGTGCAGTTGAAGGAGTCAGGACCAGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGT CTCCGGGTTTTTCATTAACCAGCCATGGTGTACACTG GGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC TGGGAGTAATATGGGCTGGAGGAAGCATAAACTTT AATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAA AGACAACTCCAAAAACCAGGTTTTCTTAAAAATGA ACAGTCTGCAAAGTGATGACACAGCCATGTACTAC TGTGCCAGAGACTATTACTACGGTATTGGTCTTGAC TATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 555
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGA CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGGTCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGATTATTATTATCCATTCACGTTCCGGCTCGGG GACAAAGTTGGAAATAAAA

		SEQ ID NO: 564
Ab29	VH	GAGGTCCTGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGG CTTCTGGATACACTTTGACTGACCACAGCATGGACT GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAAATATTCTTCCTAATAATGGTGGTAATATA TACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACACTGAC TGTCGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGC TCCGCAGCCTGACATCTGAAGACACTGCAGTCTAT AACTGTGCAAGGGGGCCACTATGGTAACTCATTGCT TACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCATAGTCTCTGC A
		SEQ ID NO: 573
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGAGAGCAGGAGAGAAGGTCCTATATACTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTTTAACAGTGGAATCAAA AAAACACTTGTGACCTGGTACCAGCAGAAACCGGGC CAGCCTCCTAAATTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTCATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TATGCAGGCTGATGACCTGGCAACTTATTACTGTCA GAATGGTTATTTTTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGG GACCAAGCTGGAGATAAAA
		SEQ ID NO: 582
Ab30	VH	CAGGTACAACCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGT CTCAGGGTTCTCATTAACCAAGTTTGGTGTAACTG GGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC TGGGAGCAATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTAT CATTCAGCTCTCATATCCAGACTGAGCATCAACAA GGATAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAACTGA GCAGTCTGCAAAATGTTGACACAGCCACTTACTACT

		GTGCCAAAAGTGGGTACGGTAATGCTATGGACTAC TGGGGTCACGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 591
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAACAGGAGAGAAGGTCACTCTGAACTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCTAA AGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAGACCGGGG CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTTATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAA TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTACTGTCA GAATGATTATTTTTTTCCATTACGTTTCGGCTCGGG GACAAAGTTGGAAATTAAA
		SEQ ID NO: 600
Ab31	VH	CAGATCCAGTTGGCGCAGTCTGGACCTGAGCTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGG CTTCTGGGTATAGTTTCACAACTATGGAATGAACT GGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGCTTAAAGTGG ATGGGCTGGATAAACACCTACAGTGGAGAGACAAA ATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTCGACTTTTC ATTGGAAACCTCTGCCAGGACAGCCTATTTGCAGA TCAAAAACCTCAAAATTGAGGACACGGCTACATAT TTCTGTGCAAGACGGGATGCTATGGACTACTGGGG TCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 609
	VL	GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCT GTCACCTCCTGGAGAGTCAGTGTCCATTTCTTGCAGG TCTAGTAAGAGTCTCCTGAATAGTAATGGTAACACT TATTTGTATTGGTTCCTACAGAGGCCAGGCCAGTCT CCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCTAACCTTGCC TCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC

		AGGGACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGG AGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTATTGTATGCAAC ATCTAGAATTTCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAA
		SEQ ID NO: 618
Ab32	VH	CAGGTGCAGTTGAAGGAGTCAGGACCAGGCCTGGT GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGT CTCCGGGTTTTTCATTAACCAGCCATGGTGTACACTG GGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGC TGGGAGTAATATGGGCTGGAGGAAGCATAAACTTT AATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAA AGACAACTCCAAAAACCAGGTTTTCTTAAAAATGA ACAGTCTGCAAAGTGATGACACAGCCATGTACTAC TGTGCCAGAGACTATTACTACGGTATTGGTCTTGAC TATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 627
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGT GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCCTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGA CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGGTCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGATTATTATTATCCATTCACGTTCCGGCTCGGG GACAAAGTTGGAAATAAAA
		SEQ ID NO: 636
Ab33	VH	GACGTGAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCATGTCTT GGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGG

		GTCGCAACCATTACTTATGGTCGTATTTACACCTAC TATCTAGACAGTGTAAGGGCCGATTCACCATCTCC AGAGACAATGCCAAAAACACCCTGTACCTGCAGAT GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCATGTATT ACTGTACAAGGATGATTACGGGGAATGCTATGGAC TCCTGGGGTCTAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 645
	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAAATCAAA AAAACACTTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGCCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT AGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGG TGTGCAGGGTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA GAATGATTATAGTTATCCGCTCACGTTCCGGTGGTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA
		SEQ ID NO: 654
Ab34	VH	GAGGTCCTGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGTTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAAATACCCTGCAAGG CTTCTGGATACACATTCTCTGACTACAACATGGACT GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGACATATTAATCCTAACAATGATAATACTATC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGAC TGTAGACAAGTCCTCCAATACAGCCTACATGGACC TCCGCAGCCTGTCATCTGAGGACACTGCAGTCTATT ACTGTGCAAGAGGGGCCTACTATGGTAACTCTATG GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTC CTCA
		SEQ ID NO: 663

	VL	GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT GTGACAGCAGGAGAGAGGGTCACTATGAGCTGCAA GTCCAGTCAGAGTCTGTAAACGGTGGAAATCAAA GGAAC TACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGG CAGTCTCCTAAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACT TGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG TGGGTCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAG TGTGCAGGCTGAGGACCTGGCAGTTTATTACTGTCA AAATGCTTATTTTTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGG GACCAAGCTGGAAATAAAA
		SEQ ID NO: 672
Ab35	VH	GATGTGTTTCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTG AAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACCGTC ACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAAC TGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTG GGTGACCTACATAGGCTACAGTGGTACCACTAGCT ACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTC GAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTG AATTCTGTGTCTACTGAGGACACAGCCACATATTAC TGTGTAAGAAGGGGGAGTTACTATGGGAGTTACTG GTTCTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCA CCGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 681
	VL	CAAGTTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCT GCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAG GGCCAGTTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTATC AGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATT TATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTCCT CACTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCGTACTCT CTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGC CACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC CACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGTTGGAAATAAAA

		SEQ ID NO: 690
Ab36	VH	GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT GCAGCCTGGAGGATCCATGAAACTCTCCTGTGTTGC CTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTACTGGATGAACTG GGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGG TTGCTCAAATTAGATTGAAATCTGATAATTATGCAA CACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGATGTTACCC ATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCT GCAAATGAACAACCTTAAGGGCTGAAGACACTGGAA TTTATTACTGCACAGCAGGCGGGGACTACTGGGGC CAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 699
	VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCC ACAACAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAA GGCCAGTCAGAATGTGGGTACTGCTGTAGCCTGGT ATCACCAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTCCTG ATTTACTCAGCATCCAATCGGTACACTGGAGTCCCT GATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACCT GGGAAATTATTTCTGTCAGCAATATATCAACTATCT TCTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAA AA
		SEQ ID NO: 169
Ab37	VH	GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT GCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCCTGTGTTGC CTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTACTGGATGAACTG GGTCCGCCAGTATCCAGAGCAGGGGCTTGAGTGGG TTGCTCAAATTAGATTGAATTCTGATAATTATGCAA CGCATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTCACC ATCTCAAGAGATGATTCCAGAAGTACTGTCTACCTA CAAATGAACAACCTTAAGGGCTGAAGACACTGGAAT

		TTATTACTGCACAGGCGGGGGGAGTACTGGGGCC AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
		SEQ ID NO: 178
	VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCC ACAACAATAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAA GGCCAGTCAGAATGTGGATACTGCTGTAGCCTGGT ATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTG ATTTACTCAGCATCCACTCGGTACACTGGAGTCCCT GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTT CACTCTCACCATTAGTAATATGCAGTCTGAAGACCT GGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATATCAGTTATCA GCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGA AA
		SEQ ID NO: 187
Ab38	VH	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAA GAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGG CTTCTGGATATACCTTCACAACTATGGAATGAGTT GGGTGAAACAGGCTCCAGGAAAGGGATTAAAGTG GATGGGCTGGATAAACACCTATTCTGGAGTGCCAA CATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCT CTTTGGAAGCCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGA TCAACAACCTCAAAAATGAGGACGCGGCTACATAT TTCTGTTCAAGGTGGTCTGGGCCCCGATCCGCTTGAG GACCACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC CTCA
		SEQ ID NO: 196
	VL	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCT GCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAC TGCCAGTTTAAGTCTAAATTACATTCAGTGGTACCG ACAGAGGTCAGGCACCTCCCCCAAACGATGGATTT ATGACACATCCAAGCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTC

		GTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCTC TCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCCTG GACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
--	--	--

Выделенный полинуклеотид, который кодирует антитела к CLDN18 (например, включая последовательности, показанные в таблице 3), может быть встроен в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии с использованием рекомбинантных методов, известных в данной области. Доступно множество векторов. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются ими, одно или более из следующих: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции. Вектор может также включать материалы, способствующие его проникновению в клетку, включая, помимо прочего, вирусную частицу, липосому или белковое покрытие.

В настоящем изобретении предложены векторы (например, клонирующие векторы или векторы экспрессии), содержащие представленную в настоящем документе последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитела, по меньшей мере один промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α), функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, и по меньшей мере один маркер выбора. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, фагмиды, космиды и искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13 и вирусы животных. Категории вирусов животных, используемых в качестве векторов экспрессии, включают ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Примеры плазмид включают pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO,

pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pCDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT и pEF-Bos и т.д.

Векторы, содержащие полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно вводить в клетку-хозяина для клонирования или экспрессии гена. Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах согласно настоящему изобретению являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например *Enterobacteriaceae* такие как *Escherichia*, например *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например *Serratia marcescans*, и *Shigella*, а также *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa* и *Streptomyces*.

Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела против CLDN18, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, наиболее часто используются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако в настоящем документе обычно доступны и применимы ряд других родов, видов и штаммов, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и мицелиальные грибы, такие как, например *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии антител или фрагментов антигена, предложенные в настоящем документе, происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты, и соответствующие перmissive клетки-хозяева насекомых от таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступны различные вирусные штаммы для трансфекции, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и штамм Bm-5 *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут быть использованы в качестве вируса согласно настоящему изобретению, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно также использовать культуры клеток растений хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, помидоров и табака.

Однако наибольший интерес вызывают клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примерами пригодных для применения линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячков (BHK, ATCC CCL 10); клеточная линия мышинной миеломы (NS0, Galfrè and Milstein (1981), *Methods in Enzymology*, 73:3-46; Sp2/0-Ag14, ATCC CRL-1581); клетки яичника китайского хомячка /-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, *Mather, Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы-буйвола (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (*Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982));

клетки MRC 5; клетки FS4 и линия гепатомы человека (Hep G2). В некоторых предпочтительных воплощениях клетка-хозяин представляет собой культивируемые клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки ВНК или клетки NS0.

В некоторых воплощениях клетка-хозяин способна продуцировать гликоинженерное антитело. Например, линия клеток-хозяев может обеспечить необходимый механизм гликозилирования во время посттрансляционной модификации. Примеры таких линий клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, клетки с измененной (повышенной или пониженной) активностью связанных с гликозилированием ферментов, таких как глюкозаминилтрансфераза (например, $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)), гликозилтрансфераза (например, $\beta(1,4)$ -галактозилтрансфераза (GT)), сиалилтрансфераза (например, $\alpha(2,3)$ -сиалилтрансфераза (ST)), маннозидаза (например, α -маннозидаза II (ManII), фукозилтрансфераза (например, ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы (FUT8), (1,3) фукозилтрансфераза), прокариотическая ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктаза (RMD), переносчик ГДФ-фукозы (GFT), нативные или полученные методом генетической инженерии.

В некоторых воплощениях клетка-хозяин характеризуется отсутствием функционального FUT8 (фукозилтрансфераза), сверхэкспрессией гетерологичного GnTIII, экспрессией прокариотической ГДФ-6-дезоксид-ликсо-4-гексулозоредуктазы (RMD) или отсутствием функционального GFT. Линия клеток-хозяев, нокаутированная по FUT8, дефицитна по фукозилированию и продуцирует афукозилированные антитела. Сверхэкспрессия GnTIII в линии клеток-хозяев (см., например, технологию Glycart от Roche) приводит к образованию разделенной пополам нефукозилированной гликозилированной формы антитела. Экспрессия RMD (например, как в системе GlymaxX[®] от ProBioGen AG) ингибирует биосинтез фукозы de novo, и, как следствие, антитела, продуцируемые такими линиями клеток-хозяев, также демонстрируют пониженное фукозилирование. Нокаут GFT в клеточной линии CHO (см., например,

технологии Beijing Mabworks Biotech) блокирует пути биосинтеза фукозы *de novo* и пути биосинтеза спасения фукозы и приводит к снижению фукозилирования.

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для продукции антител против CLDN18 и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. В другом воплощении антитело может быть получено путем гомологичной рекомбинации, известной в данной области.

Клетки-хозяева, используемые для получения антител, представленных в настоящем документе, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM), (Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, в качестве питательной среды может быть использована любая из сред, описанных в Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патенте США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или пат. США восст. 30985. Любая из этих сред при необходимости может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфата), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCINTM), следовыми элементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, как ранее использованные для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного специалиста в данной области.

При использовании рекомбинантных методов антитело может быть получено внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретировано в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то на первом этапе частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, удаляют, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описывают процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретируется в среду, надосадочные жидкости из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием имеющегося в продаже фильтра для концентрирования белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза, а для предотвращения роста посторонних примесей могут быть включены антибиотики.

Антитела к CLDN18, полученные из клеток, могут быть очищены с использованием, например, хроматографии на гидроксилапатите, гель-электрофореза, диализа, ионообменной хроматографии с ДЭАЭ-целлюлозой, осаждения сульфатом аммония, высаливания и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки.

Фармацевтическая композиция

В настоящем описании также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела к CLDN18 или их антигенсвязывающий фрагмент, химерный антигенный рецептор, полинуклеотиды, вектор или модифицированные иммунные клетки, предложенные в настоящем документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

Фармацевтически приемлемые носители для применения в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, могут включать, например, фармацевтически приемлемые жидкие, гелевые или твердые носители, водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующие/диспергирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты, разбавители, адъюванты, эксципиенты или нетоксичные вспомогательные вещества, другие компоненты, известные в данной области, или их различные комбинации. Подходящие компоненты могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связующие вещества, разрыхлители, буферы, консерванты, смазывающие вещества, ароматизаторы, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрины. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, ЭДТА, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевую кислоту, тиосорбит, бутилированный гидроксанизол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропилгаллат. Как раскрыто в настоящем документе, включение одного или более антиоксидантов, таких как метионин, в композицию, содержащую антитело или антигенсвязывающий фрагмент и конъюгаты, предложенные в настоящем документе, снижает окисление антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Это снижение окисления предотвращает или уменьшает потерю аффинности связывания, тем самым повышая стабильность антител и максимально увеличивая срок хранения. Таким образом, в некоторых воплощениях предусмотрены композиции, которые содержат одно или более антител, раскрытых в настоящем документе, и один или более антиоксидантов, таких как метионин. Кроме того, предложены способы предотвращения окисления, продления срока годности и/или повышения эффективности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предложенного в настоящем документе, путем смешивания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с одним или более антиоксидантами, такими как метионин.

Фармацевтические композиции могут представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, пиллюлю, капсулу, таблетку, состав с замедленным высвобождением или порошок. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как фармацевтической степени чистоты маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, поливинилпирролидон, сахарин натрия, целлюлозу, карбонат магния и т.д.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции входят в состав инъекционных композиций. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть приготовлены в любой традиционной форме, такой как, например, жидкий раствор, суспензия, эмульсия или твердые формы, подходящие для получения жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекций могут включать стерильные и/или апиrogenные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для смешивания с растворителем непосредственно перед применением, включая таблетки для подкожных инъекций, стерильные суспензии, готовые для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к смешиванию с носителем непосредственно перед использованием, а также стерильные и/или апиrogenные эмульсии. Растворы могут быть как водными, так и неводными.

В некоторых воплощениях парентеральные препараты с разовой дозой упакованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными и апиrogenными, как это известно и практикуется в данной области.

В некоторых воплощениях стерильный лиофилизированный порошок получают путем растворения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать эксципиент, улучшающий стабильность, или другие фармакологические компоненты порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Эксципиенты, которые могут быть применены, включают, но не ограничиваются ими, воду, декстрозу,

сорбитал, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель может содержать буфер, такой как цитратный, фосфат натрия или калия, или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном воплощении с приблизительно нейтральным pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дает желаемый состав. В одном воплощении полученный раствор распределяют по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон может содержать одну или несколько доз антител к CLDN18 или их композиции. Допускается переполнение флаконов небольшим количеством сверх необходимого для дозы или набора доз (например, приблизительно 10%), чтобы облегчить точный отбор пробы и точное дозирование. Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

Восстановление лиофилизированного порошка водой для инъекций позволяет получить препарат для парентерального введения. В одном воплощении для восстановления к лиофилизированному порошку добавляют стерильную и/или апиrogenную воду или другой жидкий подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранной терапии и может быть определено эмпирически. Антитела, а также кодирующие нуклеиновые кислоты или наборы нуклеиновых кислот, векторы, содержащие их, или клетки-хозяева, содержащие указанные векторы, как описано в настоящем документе, можно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем (эксципиентом) с образованием фармацевтической композиции для применения в лечении целевого заболевания. «Приемлемый» означает, что носитель должен быть совместим с активным ингредиентом композиции (и предпочтительно должен быть способен стабилизировать активный ингредиент) и не оказывать вредного воздействия на субъект, подлежащий лечению. Фармацевтически приемлемые эксципиенты (носители), включая буферы, хорошо известны в данной области. См., например,

Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.

В некоторых примерах описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит липосомы, содержащие антитела (или кодирующие нуклеиновые кислоты), которые могут быть получены способами, известными в данной области, такими как описанные в Epstein, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); и патентах США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США № 5013556. Особенно подходящие для применения липосомы могут быть получены методом обращенно-фазового испарения из липидной композиции, включающей фосфатидилхолин, холестерин и фосфатидилэтаноламин, дериватизированный ПЭГ (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра.

Антитела или кодирующая нуклеиновая кислота (нуклеиновые кислоты) также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики известны в данной области техники, см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В других примерах фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может быть приготовлена в формате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем указанные матрицы имеют форму формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с пролонгированным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или

поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагаемого этиленвинилацетата, разлагаемых сополимеров молочной и гликолевой кислот, таких как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида), изобутират-ацетат сахарозы и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Фармацевтические композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществить, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Композиции терапевтических антител обычно помещают в контейнер со стерильным отверстием для доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в стандартных лекарственных формах, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии или суппозитории, для перорального, парентерального или ректального введения или введения путем ингаляции или инфузии.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению дополнительно содержит один или более терапевтических агентов. В некоторых вариантах реализации один или более терапевтических агентов выбраны из группы, состоящей из амрубицина, апатиниба мезилата, атрасентана, батабулина, кальцитриола, капецитабина, цилегитида, дазатиниба, декатаниба, эдотекарина, энзастаурина, эрлотиниба, эверолимуса, гиматекана, госсипола, ипилимумаба, лонафарниба, лукантона, нейрадиба, нолатрекседа, облимерсена, олапариба, офатумумаба, ореговомаба, панитумумаба, пазопанибрубитекана, регорафениба, талампанела, тегафура, темсиролимуса, тесмилифена, тетрандрина, тицилимумаба, траметиниба, трабектедина, вандетаниба, витеспана, занолимумаба, золендроната, гистрелина, азациитидина, дексразоксана, алемтузумаба, леналидомида, гемтузумаба, кетоконазола, азотистого иприта, ибритумамаба, тиуксетана, децитабина,

гексаметилмеламина, бексаротена, тозитумомаба, триоксида мышьяка, эдитроната, циклоспорина, аспарагиназы Эдвина, эпирубицина, оксалиплатина, антитела к PD1, антитела к PDL1, антитела к HER2, ADC к HER2, 5-фторурацила и стронция 89.

Терапевтическое применение

В настоящем изобретении также предложены терапевтические способы, включающие введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, химерного антигенного рецептора, полинуклеотидов, вектора или модифицированных иммунных клеток, предложенных в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту, с обеспечением тем самым лечения или предотвращения связанного с CLDN18.2 состояния или расстройства. В некоторых воплощениях связанное с CLDN18.2 состояние или расстройство представляет собой рак, возможно указанный рак характеризуется экспрессией или сверхэкспрессией CLDN18.2. Экспрессию или сверхэкспрессию можно определить в диагностическом или прогностическом анализе путем оценки повышенных уровней CLDN18.2 в биологическом образце (таком как образец, полученный из раковой клетки или ткани, или иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль) от субъекта. Можно использовать различные методы. Например, диагностический или прогностический анализ можно использовать для оценки уровней экспрессии CLDN18.2, присутствующих на поверхности клетки (например, с помощью иммуногистохимического анализа; ИHC). В качестве альтернативы или дополнения можно измерить уровни нуклеиновой кислоты, кодирующей CLDN, в клетке, например, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; см. WO 98/45479, опубликованную в октябре 1998 г.), саузерн-блоттинга или методов полимеразной цепной реакции (PCR), например, количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Methods 132: 73-80 (1990)). Помимо вышеуказанных анализов, квалифицированному практикующему врачу доступны различные анализы *in vivo*. Например, можно подвергнуть клетки в организме пациента воздействию антитела, которое возможно помечено обнаруживаемой меткой, например радиоактивным изотопом, и можно оценить связывание антитела с клетками пациента, например, путем

внешнего сканирования на предмет радиоактивности или путем анализа биопсии, взятой у пациента, ранее подвергшегося воздействию антитела. В некоторых воплощениях состояние или расстройство, связанное с CLDN18.2, представляет собой рак, при этом рак характеризуется экспрессией CLDN18.2 на уровне менее 10000 сайтов связывания антител на клетку, менее 9000 сайтов связывания антител на клетку, менее 8000 сайтов связывания антител на клетку, менее 7000 сайтов связывания антител на клетку, менее 6000 сайтов связывания антител на клетку, менее 5000 сайтов связывания антител на клетку или менее 4000 сайтов связывания антител на клетку.

В некоторых воплощениях состояние или расстройство, связанное с CLDN18.2, представляет собой рак, при этом рак выбран из группы, состоящей из рака легкого (например мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), желудочного рака или рака желудка (например, рака желудочно-кишечного тракта), рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы), плоскоклеточного рака, рака брюшины, опухоли головного мозга (например, глиобластомы/мультиформной глиобластомы (GBM), неглиобластомной опухоли головного мозга или менингиомы), глиомы (например, эпендимомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы или смешанной глиомы, такой как олигоастроцитомы), рака шейки матки, рака яичника, рака печени (например, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы или карциномы печени), рака мочевого пузыря (например, уротелиального рака), рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, рака эндометрия или матки, карциномы слюнных желез, рака почки или почечного рака (например, рабдоидной опухоли почки), рака предстательной железы, рака вульвы, рака полового члена, анального рака (например, анальной плоскоклеточной карциномы), рака щитовидной железы, рака головы и шеи (например, рака носоглотки), рака кожи (например, меланомы или плоскоклеточного рака), остеосаркомы, саркомы Юинга, хондросаркомы, саркомы мягких тканей (например, рабдомиосаркомы, фибросаркомы,

саркомы Капоши), карциноидного рака, рака глаза (например, ретинобластомы), мезотелиомы, лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (например, острого лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (ALL) как Т-клеточного происхождения, так и В-клеточного происхождения, хронического лимфобластного/лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелогенного/миелобластного лейкоза (AML), включая тучноклеточный лейкоз, хронического миелогенного/миелоцитарного/миелобластного лейкоза (CMML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), фолликулярной лимфомы (FL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), лимфомы Беркитта (BL), грибовидного микоза, синдрома Сезари, кожной Т-клеточной лимфомы, опухоли тучных клеток, медуллобластомы, нефробластомы, солитарной плазмоцитомы, миелодиспластического синдрома, хронического и нехронического миелопролиферативного расстройства, опухоли центральной нервной системы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, рака желчного пузыря, идиопатического миелфиброза и рака у детей, такого как детские саркомы (например, нейробластома, рабдомиосаркома и остеосаркома). В некоторых воплощениях рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легких, рака желчного пузыря, колоректального рака и рака печени.

Терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, химерного антигенного рецептора, полинуклеотидов, вектора или модифицированных иммунных клеток, предложенных в настоящем документе, будет зависеть от различных факторов, известных в данной области, таких как, например, масса тела, возраст, предыдущая история болезни, принимаемые лекарства, состояние здоровья субъекта и вероятность перекрестных реакций, аллергий, чувствительности и неблагоприятных побочных эффектов, а также путь введения и степень развития заболевания. Дозировки могут быть пропорционально уменьшены или увеличены

специалистом в данной области (например, врачом или ветеринаром), как указано при этих и других обстоятельствах или требованиях.

Описанные в настоящем документе антитела можно вводить любым способом, известным в данной области, например, парентеральным (например, подкожным, внутривенным, внутримышечным, включая внутривенную инфузию, внутримышечную или внутрикожную инъекцию) или непарентеральным (например, пероральным, чрескожным, интраназальным, внутриглазным, подязычным, ректальным или местным) путями введения.

В настоящем изобретении также предложены способы применения антител к CLDN18.2.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены способы обнаружения наличия или количества CLDN18.2 в образце, включающие приведение образца в контакт с антителом и обнаружение наличия или количества CLDN18.2 в образце.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены способы диагностики связанного с CLDN18.2 заболевания или состояния у субъекта, включающие: а) приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом, предложенным в настоящем документе; б) обнаружение наличия или количества CLDN18.2 в образце; в) соотнесение наличия или количества CLDN18.2 с наличием или состоянием связанного с CLDN18.2 заболевания или состояния у субъекта.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложены наборы, содержащие антитело, предложенное в настоящем документе, возможно конъюгированное с поддающимся определению фрагментом. Указанные наборы могут быть пригодны для применения в определении CLDN18.2 или диагностике связанного с CLDN18.2 заболевания.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения также предложено применение антитела, предложенного в настоящем документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, при котором может

помочь модуляция экспрессии CLDN18.2 у субъекта, в изготовлении диагностического/прогностического реагента для диагностики/прогнозирования связанного с CLDN18.2 заболевания или состояния. Для осуществления описанного в настоящем документе способа на практике эффективное количество описанной в настоящем документе фармацевтической композиции можно вводить субъекту (например, человеку), нуждающемуся в лечении, подходящим путем, таким как внутривенное введение, например в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, внутривенным, интрацереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным, подоболочечным, пероральным, ингаляционным или местным путем. Для введения пригодны коммерчески доступные распылители для жидких составов, включая струйные распылители и ультразвуковые распылители. Жидкие составы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок можно распылять после восстановления. В качестве альтернативы, описанные в настоящем документе антитела можно вводить в виде аэрозоля с использованием фторуглеродной композиции и дозирующего ингалятора или вдыхать в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

Субъект, подлежащий лечению описанными в настоящем документе способами, может представлять собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Млекопитающие включают, помимо прочего, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. Субъект-человек, который нуждается в лечении, может представлять собой пациента-человека, имеющего, подверженного риску или подозреваемого в наличии целевого заболевания/нарушения, такого как рак или иммунное нарушение, такое как аутоиммунное заболевание.

Субъект, имеющий рак-мишень, может быть идентифицирован с помощью обычного медицинского обследования, например лабораторных тестов, функциональных тестов органов, компьютерной томографии или ультразвукового

исследования. В некоторых воплощениях субъект, подлежащий лечению описанным в настоящем документе способом, может представлять собой пациента-человека с раком, который прошел или подвергается противораковой терапии, например, химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии или хирургическому вмешательству.

Эффективность лечения целевого заболевания/нарушения можно оценить способами, хорошо известными в данной области.

Комбинированная терапия

Описанные в настоящем документе антитела к CLDN18 можно использовать в сочетании с другими типами терапии целевого заболевания, такого как рак. Описанные в настоящем документе антитела к CLDN18 можно комбинировать с противораковой терапией, например, с известными в данной области. Дополнительная противораковая терапия включает химиотерапию, хирургическое вмешательство, лучевую терапию, иммунотерапию, генную терапию и так далее.

В качестве альтернативы лечение согласно настоящему изобретению можно комбинировать с химиотерапевтическим агентом, например, аналогами пиримидина (5-фторурацил, флоксуридин, капецитабин, гемцитабин и цитарабин), аналогами пурина, антагонистами фолата и родственными ингибиторами (меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин)); антипролиферативными/антимитотическими агентами, включая натуральные продукты, такие как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин и винорелбин), разрушители микротрубочек, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навельбин, эпидиподофиллотоксины (этопозид, тенипозид), повреждающие ДНК агенты (актиномицин, амсакрин, антрациклины, блеомицин, бусульфан, камптотецин, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитоксан, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, гексаметиленамин, оксалиплатин, ифосфамид, мелфалан, мехлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевину, пликамицин, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, триэтилентифосфорамида и этопозид (VP16)); антибиотики, такие как дактиномицин

(актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин; ферменты (L-аспарагиназу, которая систематически метаболизирует L-аспарагин и устраняет клетки, не обладающие способностью синтезировать собственный аспарагин); антиагреганты; антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (мехлорэтамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан, хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (гексаметилмеламин и тиотепу), алкилсульфонаты-бусульфан, нитрозомочевины (кармустин (BCNU) и аналоги, стрептозоцин), тразены-дакарбазинин (DTIC); антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат); координационные комплексы платины (цисплатин, карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевину, митотан, аминоклотедин; гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид, нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол); антикоагулянты (гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина); фибринолитические агенты (такие как активатор тканевого плазминогена, стрептокиназа и урокиназа), аспирин, дипиридамол, тиклопидин, клопидогрел, абциксьимаб; противомиграционные агенты; антисекреторные агенты (бевелдин); иммунодепрессанты (циклоспорин, такролимус (FK-506), сиролимус (рапамицин), азатиоприн, микофенолата мофетил); антиангиогенные соединения (например, TNP-470, генистеин, бевацизумаб) и ингибиторы фактора роста (например, ингибиторы фактора роста фибробластов (FGF)); блокатор ангиотензиновых рецепторов; доноры оксида азота; антисмысловые олигонуклеотиды; антитела (трастузумаб); ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки (третиноин); ингибиторы mTOR, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин (адриамицин), амсакрин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин и митоксантрон, топотекан, иринотекан), кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон и пренизолон); ингибиторы киназы сигнальной трансдукции фактора роста; индукторы митохондриальной дисфункции и активаторы каспаз; и разрушители

хроматина. В некоторых воплощениях лечение согласно настоящему изобретению может быть комбинировано с одним или более терапевтическими агентами, выбранными из группы, состоящей из амрубицина, апатиниба мезилата, атразентана, батабулина, кальцитриола, капецитабина, циленгитида, дазатиниба, декатаниба, эдотекарина, энзастаурина, эрлотиниба, эверолимуса, гиматекана, госсипола ипилимумаба, лонафарниба, люкантона, нейрадиба, нолатрекседа, облимерсена, олапариба, офатумумаба, ореговомаба, панитумумаба, пазопанибрубитекана, регорафениба, талампанела, тегафура, темсиролимуса, тесмилифена, тетрандрина, тицилимумаба, траметиниба, трабектедина, вандетаниба, витеспана, занолимумаба, золендроната, гистрелина, азацитидина, дексразоксана, алемтузумаба, леналидомида, гемтузумаба, кетоконазола, азотистого иприта, ибритумомаба, тиуксетана, децитабина, гексаметилмеламина, бексаротена, тозитумомаба, триоксида мышьяка, эдитроната, циклоспорина, аспарагиназы Эдвина, эпирубицина, оксалиплатина, антитела к PD1, антитела к PDL1, антитела к HER2, ADC к HER2 и 5-фторурацила и стронция 89.

Когда используют второй терапевтический агент, такой агент можно вводить одновременно или последовательно (в любом порядке) с терапевтическим агентом, описанным в настоящем документе. При совместном введении с дополнительным терапевтическим агентом подходящие терапевтически эффективные дозы для каждого агента могут быть снижены благодаря аддитивному или синергическому действию.

Наборы для терапевтического применения

В настоящем изобретении также предложены наборы для применения при лечении или облегчении целевых заболеваний, таких как рак и иммунные нарушения, как описано в настоящем документе. Такие наборы могут включать один или более контейнеров, содержащих антитела к CLDN18, например любые из описанных в настоящем документе, и, необязательно, второй терапевтический агент для совместного применения с антителами к CLDN18, который также описан в настоящем документе.

В некоторых воплощениях набор может содержать инструкции по применению в соответствии с любым из описанных в настоящем документе способов. Включенные

инструкции могут включать описание введения антител к CLDN18 и, возможно, второго терапевтического агента для лечения, отсрочки начала или облегчения целевого заболевания, как описано в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения, на основе определения наличия у этого индивидуума целевого заболевания, например применения описанного в настоящем документе способа диагностики. В других воплощениях инструкции содержат описание введения антитела индивидууму с риском целевого заболевания.

Инструкции, касающиеся применения антител к CLDN18, обычно включают информацию о дозировке, схеме и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или субстандартные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах согласно настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в комплект), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске).

На этикетке или листке-вкладыше указано, что композицию используют для лечения, отсрочки начала и/или облегчения заболевания, такого как рак или иммунные нарушения (например, аутоиммунное заболевание). Инструкции могут быть предоставлены для применения любого из способов, описанных в настоящем документе.

Наборы согласно настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается ими, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т. п. Также рассматриваются упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных

инъекций). Контейнер может также иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитела к CLDN18, такие как описано в настоящем документе.

В наборах могут возможно предоставляться дополнительные компоненты, такие как буферы и пояснительная информация. Обычно набор включает контейнер и этикетку или лист-вкладыш (вкладыши) на контейнере или связанный с ним. В некоторых воплощениях в описании предложены готовые изделия, включающие содержимое наборов, описанных выше.

Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны интерпретироваться как ограничивающие объем изобретения. Все конкретные композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично входят в объем настоящего изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы предназначены не для ограничения изобретения, а просто для иллюстрации конкретных воплощений, подпадающих под объем изобретения. Специалист в данной области может разработать эквивалентные композиции, материалы и способы, не используя изобретательский потенциал и не выходя за рамки объема изобретения. Следует понимать, что в процедуры, описанные в настоящем документе, можно внести множество вариаций, оставаясь при этом в рамках настоящего изобретения. Замысел авторов настоящего изобретения состоит в том, чтобы такие вариации были включены в объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Разработка гибридомы

1. Методы

1.1. Иммунизация и определение титра сыворотки

Иммуноген и стратегии иммунизации, применяемые в настоящем изобретении, включают иммунизацию клетками (клетки, сверхэкспрессирующие клаудин18.2

(CLDN18.2) человека, например, HEK293F-hCLDN18.2), иммунизацию геном (экспрессирующая конструкция полноразмерного человеческого CLDN18.2) и иммунизацию белком (рекомбинантный человеческий белок CLDN18.2).

Мышей Balb/c или SJL разделяли на 5 групп по 5 мышей в каждой группе. Каждую группу мышей иммунизировали клетками, сверхэкспрессирующими клаудин18.2 (CLDN18.2) человека (клетки клаудина 18.2, например, HEK293F-hCLDN18.2), полноразмерной экспрессионной конструкцией человеческого CLDN18.2 (конструкцией для экспрессии клаудина18.2) или рекомбинантным человеческим белком CLDN18.2 (рекомбинантным белком клаудин18.2). Схемы стратегий иммунизации представлены в таблице 4. После первичной иммунизации проводили несколько повторных бустерных инъекций до тех пор, пока у животных не развились удовлетворительные титры антисыворотки, подходящие для развития гибридомы. Все стратегии иммунизации осуществляли параллельно, чтобы сравнить эффективность и иммунный ответ на уровне сыворотки.

Таблица 4. Схема стратегий иммунизации

Группа	Иммуноген	Путь	Животное/ штамм	Размер группы	Дозировка
1	Клетки с клаудином18.2	В.Б.	SJL	5	0,5-1×10 ⁷ клеток
2	Клетки с клаудином18.2	В.Б.	Balb/c	5	0,5-1×10 ⁷ клеток
3	Конструкция экспрессии клаудина 18.2	Генная пушка	SJL	5	4 мкг
4	Конструкция экспрессии клаудина 18.2	Генная пушка	Balb/c	5	4 мкг
5	Рекомбинантный белок клаудин18.2	В.Б.	SJL	5	25-50 мкг

В.Б. - внутрибрюшинно

1.1.2. Схемы иммунизации

Подробная схема иммунизации для клеточной иммунизации показана в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Схема иммунизации (иммунизация клетками)

День 0	Предварительный отбор крови (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первично: $0,5-1 \times 10^6$ /мышь, в/б
14	Бустерная инъекция 1: $0,5-1 \times 10^7$ клеток на мышь, в/б
21	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки на мышь) (ТВ1)
22	Отбор крови для исследования FACS
35	Бустерная инъекция 2: $0,5-1 \times 10^7$ клеток на мышь, в/б
42	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки на мышь) (ТВ2)
43	Отбор крови для исследования FACS
44	Анализ данных и завершение фазы
56	Бустерная инъекция перед слиянием (последняя): $0,5-1 \times 10^7$ клеток на мышь, в/б
Животные, не выбранные для слияния клеток, будут содержаться в клетке и могут быть подвергнуты дополнительной бустерной иммунизации.	

Подробная схема иммунизации для иммунизации геном представлена в таблице 6 ниже.

Таблица 6. Схема иммунизации (иммунизация геном)

День 0	Предварительный отбор крови (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первично: 1 мкг/инъекция, 4 инъекции/животное
14	Бустерная инъекция 1: 1 мкг/инъекция, 4 инъекций/животное
21	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки/мышь)
22	Отбор крови для исследования FACS
28	Бустерная инъекция 2: 1 мкг/инъекция, 4 инъекции/животное
35	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки/мышь)
36	Отбор крови для исследования FACS
42	Бустерная инъекция 3: 1 мкг/инъекция, 4 инъекции/животное

49	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки/мышь)
50	Отбор крови для исследования FACS
51	Анализ данных и завершение фазы
63	Бустерная инъекция перед слиянием (последняя): $0,5-1 \times 10^6$ на мышь
67	Слияние
Животные, не выбранные для слияния клеток, будут содержаться в клетке и могут быть подвергнуты дополнительной бустерной иммунизации.	

Подробная схема иммунизации для иммунизации белком представлена в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Схема иммунизации (иммунизация белком)

День 0	Предварительный отбор крови (15-30 мкл сыворотки/мышь) Первично: 50 мкг/мышь, в/б, CFA
14	Бустерная инъекция 1: 25 мкг/мышь, в/б, IFA
21	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки/мышь) (TB1)
22	Отбор крови для исследования FACS
35	Бустерная инъекция 2: 25 мкг/мышь, в/б, IFA
42	Отбор крови для исследования (15-30 мкл сыворотки/мышь) (TB2)
43	Отбор крови для исследования FACS
44	Анализ данных и завершение фазы
56	Бустерная инъекция перед слиянием (последняя), 25 мкг/мышь, в/б
Животные, не выбранные для слияния клеток, будут содержаться в клетке и могут быть подвергнуты дополнительной бустерной иммунизации.	

1.1.3. Анализ крови на антисыворотку крови

Осуществляли отбор крови для анализа и проводили оценку с применением FACS на клеточной линии СНО-К1, стабильно сверхэкспрессирующей человеческий клаудин18.2 (т.е. СНОК1-18.2).

1.2. Генерация гибридом и скрининг

1.2.1. Слияние клеток и скрининг

Слияние: Слияние спленоцитов проводили на мышах, которые проявляли наилучший ответ на иммунизацию, определенный с помощью анализа крови FACS.

Лимфоциты из селезенки и лимфатических узлов сливали с клеточной линией Sp2/0-Ag14 с использованием оптимизированного протокола электрослияния. Для обеспечения успеха проекта было выполнено множество слияний.

Скрининг и размножение: Клетки после слияния высевали (от 10^4 до 10^5 на лунку) в набор 96-луночных планшето. Планшеты контролировали на предмет роста и добавляли питательные вещества еженедельно. Лунки с ростом клеток подвергали скринингу с помощью первичных скрининговых анализов через 10-14 дней с помощью Acumen (HCl488NM) и/или других подходящих анализов. Множественные слияния для каждого антигена-мишени были выполнены и проверены с помощью Acumen. Положительные родительские клоны, показавшие положительное связывание с СНОК1-18.2 при первичном скрининге, размножали в 24-луночных планшетах для вторичного скрининга.

Дополнительный скрининг антител: После первичного скрининга положительные родительские клоны, размноженные в 24-луночных планшетах, снова подвергали скринингу с помощью анализа, описанного в способе «воронки для скрининга» гибридом ниже в разделе 1.2.2.

Для субклонирования были выбраны представляющие интерес гибридомы.

1.2.2. Субклонирование гибридом, скрининг и криоконсервация

Субклонирование: Родительские гибридомы с желаемой реактивностью и изотипами из «воронки для скрининга», описанной выше, затем субклонировали с помощью нескольких раундов лимитирующих разведений или сортировки отдельных клеток до тех пор, пока не были получены моноклоны.

Скрининг и размножение: Планшеты для субклонирования подвергали скринингу с помощью анализа Acumen, и субклоны с хорошей связывающей способностью размножали до 24 лунок для подтверждающих тестов. Специфичность и перекрестная реактивность этих субклонов были подтверждены анализом FACS. Вкратце, родительские клетки СНО-K1, СНОК1-18.2, клеточную линию СНО-K1, стабильно сверхэкспрессирующую клаудин18.1 человека (СНОК1-18.1), клеточную

линию СНО-К1, стабильно сверхэкспрессирующую клаудин18.2 макаки-резус (СНОК1-rh18.2), и клеточную линию СНО-К1, стабильно сверхэкспрессирующую клаудин18.2 мыши (СНОК1-m18.2), инкубировали с антителами, продуцируемыми каждым субклоном соответственно. Вторичное антитело, конъюгированное с флуоресцентным красителем, использовали для обнаружения связывания первичного антитела с клетками. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) измеряли с помощью анализа FACS.

Криоконсервация: Желаемые субклональные клеточные линии секвенировали и далее размножали в культуральных колбах для криоконсервации. Изначально криоконсервации подвергали 4-6 флаконов на клеточную линию при $0,5-1,0 \times 10^7$ клеток/флакон. При желании для выбранных наиболее ценных клеточных линий могут быть созданы основной банк клеток и рабочий банк клеток.

2. Результаты

Авторы настоящего изобретения обнаружили 38 антител с уникальными последовательностями, демонстрирующими положительное связывание с клетками СНО-К1, стабильно сверхэкспрессирующими человеческий белок клаудин18.2 (СНОК1-18.2). Среди них 33 антитела не связывались с клеточной линией СНО-К1, стабильно сверхэкспрессирующей белок клаудин 18.1 человека (СНОК1-18.1), что позволяет предположить, что эти антитела специфически распознают клаудин 18.2. Пять антител имели положительное связывание как с СНОК1-18.2, так и с СНОК1-18.1, но не связывались с родительскими клетками СНОК1, что позволяет предположить, что эти антитела являются антителами, распознающими пан-клаудин 18. Все 38 антител могли связываться с белком клаудином 18.2 обезьяны или мыши. MFI антител, окрашивающих СНОК1-18.2, СНОК1-18.1, СНОК1-rh18.2, СНОК1-m18.2, обнаруженных с помощью FACS, сведены в таблицу 8, представленную ниже. Антитела к пан-клаудину18 подчеркнуты.

Таблица 8. MFI антител, связывающихся с различными линиями клеток

Клон	SEQ ID NO VH-CDR 1, VH-CDR 2, VH-CDR 3 (верхняя) или VL-CDR 1, VL-CDR 2, VL-CDR 3 (нижняя)	FACS MFI (CHOK1- 18.1)	FACS MFI (CHOK1- 18.2)	FACS MFI (CHOK1- rh18.2)	FACS MFI (CHOK1- m18.2)
Ab01	<u>SEQ ID NO:</u> <u>18, 20, 22</u>	<u>7247,1</u>	<u>12315,7</u>	<u>8383,4</u>	<u>12698,6</u>
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>27, 29, 31</u>				
Ab02	<u>SEQ ID NO:</u> <u>36, 38, 40</u>	101,4	1378,9	1402,4	2036
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>45, 47, 49</u>				
Ab03	<u>SEQ ID NO:</u> <u>54, 56, 58</u>	95,6	1957,3	1434,7	2973,8
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>63, 65, 67</u>				
Ab04	<u>SEQ ID NO:</u> <u>72 и 74, GDY</u>	<u>6920</u>	<u>17564,3</u>	<u>2133</u>	<u>8444</u>
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>81, 83, 85</u>				
Ab05	<u>SEQ ID NO:</u> <u>90, 92, 94</u>	97	16003,9	9851,9	12520,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>99, 101, 103</u>				
Ab06	<u>SEQ ID NO:</u> <u>108, 110, 112</u>	789,4	46072,7	13988,5	13203,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>117, 119, 121</u>				

Ab07	<u>SEQ ID NO:</u> <u>126, 128, 130</u>	764,4	13716,6	9042	15007,2
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>135, 137, 139</u>				
Ab08	<u>SEQ ID NO:</u> <u>144, 146, 148</u>	97	19354	8351,8	13100,6
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>153, 155, 157</u>				
Ab09	<u>SEQ ID NO:</u> <u>198, 200, 202</u>	95,6	17055,7	8104,1	12561,9
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>207, 209, 211</u>				
Ab10	<u>SEQ ID NO:</u> <u>216, 218, 220</u>	80,8	8401,8	7071,4	17133,6
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>225, 227, 229</u>				
Ab11	<u>SEQ ID NO:</u> <u>234, 236, 238</u>	80,8	9799	7803,5	11248,4
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>243, 245, 247</u>				
Ab12	<u>SEQ ID NO:</u> <u>252, 254, 256</u>	83,8	8816,3	7613,1	13134,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>261, 263, 265</u>				
Ab13	<u>SEQ ID NO:</u> <u>270, 272, 274</u>	82,3	7463,2	5627,9	12543,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>279, 281, 283</u>				
Ab14	<u>SEQ ID NO:</u> <u>288, 290, 292</u>	97	21360,6	6845,1	13628,4
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>297, 299, 301</u>				

Ab15	<u>SEQ ID NO:</u> <u>306, 308, 310</u>	80,8	7386,8	6319,5	12165,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>315, 317, 319</u>				
Ab16	<u>SEQ ID NO:</u> <u>324, 326, 328</u>	80,8	8170,3	6662	14313,4
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>333, 335, 337</u>				
Ab17	<u>SEQ ID NO:</u> <u>342, 344, 346</u>	82,3	11454,2	6681,1	13289,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>351, 353, 355</u>				
Ab18	<u>SEQ ID NO:</u> <u>360, 362, 364</u>	79,4	9910,7	7885,1	13519,6
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>369, 371, 373</u>				
Ab19	<u>SEQ ID NO:</u> <u>378, 380, 382</u>	80,8	7343,4	6293,1	13391,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>387, 389, 391</u>				
Ab20	<u>SEQ ID NO:</u> <u>396, 398, 400</u>	82,3	7580,8	7047,2	13845,9
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>405, 407, 409</u>				
Ab21	<u>SEQ ID NO:</u> <u>414, 416, 418</u>	79,4	10079,8	8239,4	15216,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>423, 425, 427</u>				
Ab22	<u>SEQ ID NO:</u> <u>432, 434, 436</u>	82,3	9024,3	7329,4	15518,1
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>441, 443, 445</u>				

Ab23	<u>SEQ ID NO:</u> <u>450, 452, 454</u>	82,3	8597,3	7242,7	16527,2
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>459, 461, 463</u>				
Ab24	<u>SEQ ID NO:</u> <u>468, 470, 472</u>	80,8	10085,7	7519,1	12839,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>477, 479, 481</u>				
Ab25	<u>SEQ ID NO:</u> <u>486, 488, 490</u>	82,3	12559,7	11970,9	23445
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>495, 497, 499</u>				
Ab26	<u>SEQ ID NO:</u> <u>504, 506, 508</u>	80,8	9731,4	8292,3	15676,1
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>513, 515, 517</u>				
Ab27	<u>SEQ ID NO:</u> <u>522, 524, 526</u>	97	7147,1	9241,9	8236,4
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>531, 533, 535</u>				
Ab28	<u>SEQ ID NO:</u> <u>540, 542, 544</u>	205,8	8878,8	11085,3	9531,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>549, 551, 553</u>				
Ab29	<u>SEQ ID NO:</u> <u>558, 560, 562</u>	97	19077,7	25720,6	21851,6
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>567, 569, 571</u>				
Ab30	<u>SEQ ID NO:</u> <u>576, 578, 580</u>	98,5	7563,2	10476,7	9613,8
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>585, 587, 589</u>				

Ab31	<u>SEQ ID NO:</u> <u>594, 596, 598</u>	97	5524,3	8010	7789,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>603, 605, 607</u>				
Ab32	<u>SEQ ID NO:</u> <u>612, 614, 616</u>	172	8731,1	11070,6	9237,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>621, 623, 625</u>				
Ab33	<u>SEQ ID NO:</u> <u>630, 632, 634</u>	97	8195,3	9659,4	9753,5
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>639, 641, 643</u>				
Ab34	<u>SEQ ID NO:</u> <u>648, 650, 652</u>	91,1	9072,8	6719,4	10670,7
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>657, 659, 661</u>				
Ab35	<u>SEQ ID NO:</u> <u>666, 668, 670</u>	92,6	11264,6	8339,3	9613,8
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>675, 677, 679</u>				
<u>Ab36</u>	<u>SEQ ID NO:</u> <u>684, 686, 688</u>	<u>4304,2</u>	<u>18040,7</u>	<u>17420,4</u>	<u>21601,1</u>
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>693, 695, 697</u>				
<u>Ab37</u>	<u>SEQ ID NO:</u> <u>163, 165, 167</u>	<u>4589,9</u>	<u>15168,3</u>	<u>16699,4</u>	<u>18634,8</u>
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>172, 174, 176</u>				
<u>Ab38</u>	<u>SEQ ID NO:</u> <u>181, 183, 185</u>	<u>4472,6</u>	<u>15683,7</u>	<u>15612,6</u>	<u>20379,2</u>
	<u>SEQ ID NO:</u> <u>190, 192, 194</u>				

Пример 2: Характеристика антител: аффинность

1. Способы

Последовательности 15 мышинных антител из таблицы 8 были выбраны для создания и получения химерных антител IgG1 человека. Аффинность связывания этих антител и эталонного антитела (т.е. IMAV362 (золбетуксимаба)) с клетками CHOK1-18.2 и линией клеток рака желудка, полученной от пациента (т.е. GAXC031), определяли с помощью анализа FACS. Протокол анализа FACS был описан следующим образом:

а. Клетки расщепляли с использованием фермента TrypLE™ Express (1X), а затем центрифугировали собранные клетки при 400 g в течение 5 минут и удаляли супернатант.

б. Клетки дважды промывали холодным буфером FACS путем центрифугирования при 400 g в течение 5 мин и удаляли супернатант.

в. Ресуспендировали клетки и высевали 2×10^5 клеток/лунка в планшет для анализа в 50 мкл буфера FACS, затем добавляли 50 мкл первичного антитела (конечная концентрация первичного антитела: 50,00, 16,67, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02, 0,01, 0,00 мкг/мл) и инкубировали при 40°C в течение 1 часа.

г. Клетки дважды промывали, используя условие со стадии (б), а затем клетки ресуспендировали с разбавленным вторичным антителом в количестве 100 мкл на лунку (то есть AlexaFluor488-против IgG человека) и инкубировали при 4°C в течение 1 часа в темноте.

д. Дважды промывали клетки, используя условия со стадии (б), а затем клетки ресуспендировали с холодным буфером FACS в количестве 100 мкл на лунку. Клетки держали в темноте для анализа FACS.

2. Результаты

Аффинность связывания выбранных антител с CHOK1-18.2 была выше или сравнима с эталонным антителом IMAV362 (см. таблицу 9 и фигуру 3).

По сравнению с IMAV362 максимальная MFI (концентрация первичных антител при 50 мкг/мл) выбранных антител на клетках GAXC031 и CHOK1-18.2 с низким уровнем экспрессии клаудина 18.2 была намного выше (см. таблицу 9).

Выбранные антитела были более чувствительны к клеткам GAXC031, экспрессирующим клаудин18.2 с низким уровнем экспрессии по сравнению с IMAB362 (см. фигуру 2) с более высокой максимальной MFI и более высокой или сопоставимой EC₅₀ (см. таблицу 9 и фигуру 3).

Таблица 9. Аффинность связывания антител с GAXC031 и CHOK1-18.2 («ch» относится к химерным)

Клоны	SEQ ID NO VH-CDR 1, VH-CDR 2, VH-CDR 3 (верхняя) и VL-CDR 1, VL-CDR 2, VL-CDR 3 (нижняя)	GAXC031		CHOK1-18.2	
		MAX MFI	EC ₅₀ (нМ)	MAX MFI	EC ₅₀ (нМ)
IMAB362	<u>SEQ ID NO: 2, 4, 6</u>	742	36,11	49613	5,686
	<u>SEQ ID NO: 10, 12, 14</u>				
chAb06	<u>SEQ ID NO: 108, 110, 112</u>	5462	/	92848	5,425
	<u>SEQ ID NO: 117, 119, 121</u>				
chAb10	<u>SEQ ID NO: 216, 218, 220</u>	6937	29,24	80356	2,274
	<u>SEQ ID NO: 225, 227, 229</u>				
chAb15	<u>SEQ ID NO: 306, 308, 310</u>	6112	31,86	94002	4,645
	<u>SEQ ID NO: 315, 317, 319</u>				
chAb17	<u>SEQ ID NO: 342, 344, 346</u>	4231	94,18	83797	4,736
	<u>SEQ ID NO: 351, 353, 355</u>				
chAb04	<u>SEQ ID NO: 72 и 74, GDY</u>	3864	/	75326	2,14
	<u>SEQ ID NO: 81, 83, 85</u>				
chAb05	<u>SEQ ID NO: 90, 92, 94</u>	4599	73,81	83869	5,001
	<u>SEQ ID NO: 99, 101, 103</u>				
chAb08	<u>SEQ ID NO: 144, 146, 148</u>	5834	/	71852	3,6
	<u>SEQ ID NO: 153, 155, 157</u>				
chAb11	<u>SEQ ID NO: 234, 236, 238</u>	6425	/	85566	3,635
	<u>SEQ ID NO: 243, 245, 247</u>				
chAb18	<u>SEQ ID NO: 360, 362, 364</u>	3686	/	60243	7,715
	<u>SEQ ID NO: 369, 371, 373</u>				

chAb24	<u>SEQ ID NO: 468, 470, 472</u>	5859	/	64484	4,989
	<u>SEQ ID NO: 477, 479, 481</u>				
chAb25	<u>SEQ ID NO: 486, 488, 490</u>	3015	/	56138	8,266
	<u>SEQ ID NO: 495, 497, 499</u>				
chAb20	<u>SEQ ID NO: 396, 398, 400</u>	6265	42,94	65685	3,882
	<u>SEQ ID NO: 405, 407, 409</u>				
chAb30	<u>SEQ ID NO: 576, 578, 580</u>	4462	/	65007	9,761
	<u>SEQ ID NO: 585, 587, 589</u>				
chAb29	<u>SEQ ID NO: 558, 560, 562</u>	5635	/	63401	6,629
	<u>SEQ ID NO: 567, 569, 571</u>				
chAb31	<u>SEQ ID NO: 594, 596, 598</u>	3773	/	59932	5,165
	<u>SEQ ID NO: 603, 605, 607</u>				

Пример 3: Характеристика антител: ADCC

1. Способы

Клетки GAXC031 помечали лигандом, усиливающим флуоресценцию (реагент DELFIA BATDA, Perkin Elmer, AD0116) в соответствии с руководством по эксплуатации (то есть клетки $1 \cdot 10^6$ /мл были помечены лигандом, усиливающим флуоресценцию, 2 мкл/мл (реагент DELFIA BATDA), и инкубированы в течение 20 мин при 37°C в инкубаторе для клеток) и 10000 клеток/лунку в 100 мкл высевали в 96-луночный стерильный планшет с V-образным дном (Corning, номер по каталогу 3894). После этого добавляли 50 мкл серийно разведенных антител, перечисленных в таблице 9 (с градиентом концентрации 100 нМ, 20 нМ, 4 нМ, 0,8 нМ, 0,16 нМ, 0,032 нМ, 0,0064 нМ, 0,00128 нМ, 0,000256 нМ и 0 нМ), в каждую лунку и инкубировали планшет при 37°C, 5% CO₂ в течение 5-10 мин, тем временем собирали клетки NK-92 CD16a 176V и ресуспендировали их в среде RPMI1640 (Gibco, номер по каталогу 11835-030) без фенолового красного + 10% FBS до $1 \cdot 10^6$ /мл. 50 мкл клеток NK92/CD16a, как указано, добавляли в каждую лунку планшета для анализа. После 2 часов инкубации при 37°C, 5% CO₂, 25 мкл супернатанта переносили на новый планшет для обнаружения с плоским

дном (PERKIN ELMER, номер по каталогу AAAND-0001). Добавляли 200 мкл раствора европия (Perkin Elmer, Envision 2105, AD0116-B, партия № 2610848) и встряхивали планшет при 250 об/мин в течение 15 минут при комнатной температуре и определяли значения с помощью Envision (Perkin Elmer, Envision 2105).

2. Результаты

Все антитела согласно настоящему изобретению показали сильный ADCC-эффект на клетках GAXC031. Антитела согласно настоящему изобретению показали более высокое максимальное уничтожение клеток, индуцированное ADCC, на клетках GAXC031 и более низкую EC_{50} по сравнению с эталонным антителом (то есть IMAB362) (см. таблицу 10 и фигуру 4).

Таблица 10. Максимальный процент уничтожения GAXC031 и EC_{50} вызванного антителом эффекта ADCC

Идентификатор образцов	SEQ ID NO VH-CDR 1, VH-CDR 2, VH-CDR 3 (верхняя) и VL-CDR 1, VL-CDR 2, VL-CDR 3 (нижняя)	Максимальное уничтожение опухолевых клеток (% от контроля)	EC_{50} (нМ)
IMAB362	<u>SEQ ID NO: 2, 4, 6</u>	30,68	36,08
	<u>SEQ ID NO: 10, 12, 14</u>		
chAb06	<u>SEQ ID NO: 108, 110, 112</u>	40,56	3,008
	<u>SEQ ID NO: 117, 119, 121</u>		
chAb10	<u>SEQ ID NO: 216, 218, 220</u>	55,17	1,68
	<u>SEQ ID NO: 225, 227, 229</u>		
chAb15	<u>SEQ ID NO: 306, 308, 310</u>	36,52	2,652

	<u>SEQ ID NO: 315,</u> <u>317, 319</u>		
chAb17	<u>SEQ ID NO: 342,</u> <u>344, 346</u>	60,62	2,456
	<u>SEQ ID NO: 351,</u> <u>353, 355</u>		
chAb04	<u>SEQ ID NO: 72 и 74,</u> <u>GDY</u>	/	/
	<u>SEQ ID NO: 81, 83,</u> <u>85</u>		
chAb05	<u>SEQ ID NO: 90, 92,</u> <u>94</u>	57,91	5,925
	<u>SEQ ID NO: 99, 101,</u> <u>103</u>		
chAb08	<u>SEQ ID NO: 144,</u> <u>146, 148</u>	69,35	2,216
	<u>SEQ ID NO: 153,</u> <u>155, 157</u>		
chAb11	<u>SEQ ID NO: 234,</u> <u>236, 238</u>	54,68	3,702
	<u>SEQ ID NO: 243,</u> <u>245, 247</u>		
chAb18	<u>SEQ ID NO: 360,</u> <u>362, 364</u>	61,5	5,07
	<u>SEQ ID NO: 369,</u> <u>371, 373</u>		
chAb24	<u>SEQ ID NO: 468,</u> <u>470, 472</u>	66,59	4,457
	<u>SEQ ID NO: 477,</u> <u>479, 481</u>		
chAb25	<u>SEQ ID NO: 486,</u> <u>488, 490</u>	76,85	8,38

	<u>SEQ ID NO: 495,</u> <u>497, 499</u>		
chAb20	<u>SEQ ID NO: 396,</u> <u>398, 400</u>	62,86	4,141
	<u>SEQ ID NO: 405,</u> <u>407, 409</u>		
chAb30	<u>SEQ ID NO: 576,</u> <u>578, 580</u>	80,2	7,441
	<u>SEQ ID NO: 585,</u> <u>587, 589</u>		
chAb29	<u>SEQ ID NO: 558,</u> <u>560, 562</u>	60,94	5,267
	<u>SEQ ID NO: 567,</u> <u>569, 571</u>		
chAb31	<u>SEQ ID NO: 594,</u> <u>596, 598</u>	78,84	8,159
	<u>SEQ ID NO: 603,</u> <u>605, 607</u>		

Пример 4: Характеристика антитела: CDC

1. Способы

Клетки GAXC031 доводили до 1×10^5 /мл в среде L-15 (GE HYCLONE номер по каталогу SH30525.01), затем высевали 50 мкл клеток в 96-луночный планшет (Corning, номер по каталогу № 3903), в каждую лунку вносили 25 мкл серийно разведенного антитела (с градиентом концентрации 1000 нМ, 333,33 нМ, 111,11 нМ, 37,04 нМ, 12,35 нМ, 4,12 нМ, 1,37 нМ, 0,46 нМ, 0,15 нМ и 0 нМ). После инкубации планшета при 37°C, 5% CO₂ в течение 30 мин в каждую лунку добавляли 25 мкл компонента нормальной сыворотки человека (Quidel Corporation, Cat A113) (конечная концентрация 20%) и инкубировали в течение ночи. На 2-й день в лунки добавляли 50 мкл люминесцентного буфера Cell Titer-Glo (Promega, номер по каталогу G7572), встряхивали планшет в

течение 2 минут и помещали планшет при комнатной температуре на 10 минут. Сигналы измеряли с помощью Spectra Max M5.

2. Результаты

Все антитела согласно настоящему изобретению показали сильный CDC-эффект на клетках GAXC031. Антитела согласно настоящему изобретению показали более высокое максимальное уничтожение клеток, индуцированное CDC, на клетках GAXC031 и более низкую EC_{50} по сравнению с эталонным антителом (то есть IMAB362) (см. таблицу 11 и фигуру 3).

Таблица 11. Максимальный процент уничтожения GAXC031 и EC_{50} индуцированного антителом CDC-эффекта

Идентификатор образцов	SEQ ID NO VH-CDR 1, VH-CDR 2, VH-CDR 3 (верхняя) и VL-CDR 1, VL-CDR 2, VL-CDR 3 (нижняя)	Макс. CDC индуцировали уничтожение опухолевых клеток (% контроля)	EC_{50} (нМ)
IMAB362	SEQ ID NO: 2, 4, 6	52,52	809,4
	SEQ ID NO: 10, 12, 14		
chAb06	SEQ ID NO: 108, 110, 112	75,38	9,722
	SEQ ID NO: 117, 119, 121		
chAb10	SEQ ID NO: 216, 218, 220	82,745	2,695
	SEQ ID NO: 225, 227, 229		
chAb15	SEQ ID NO: 306, 308, 310	77,44	8,155
	SEQ ID NO: 315, 317, 319		

chAb17	<u>SEQ ID NO: 342, 344,</u> <u>346</u>	70,81	9,925
	<u>SEQ ID NO: 351, 353,</u> <u>355</u>		
chAb05	<u>SEQ ID NO: 90, 92, 94</u>	78,86	17,75
	<u>SEQ ID NO: 99, 101, 103</u>		
chAb08	<u>SEQ ID NO: 144, 146,</u> <u>148</u>	68,37	13,6
	<u>SEQ ID NO: 153, 155,</u> <u>157</u>		
chAb11	<u>SEQ ID NO: 234, 236,</u> <u>238</u>	71,15	19,41
	<u>SEQ ID NO: 243, 245,</u> <u>247</u>		
chAb18	<u>SEQ ID NO: 360, 362,</u> <u>364</u>	75,3	35,02
	<u>SEQ ID NO: 369, 371,</u> <u>373</u>		
chAb24	<u>SEQ ID NO: 468, 470,</u> <u>472</u>	70,73	12,81
	<u>SEQ ID NO: 477, 479,</u> <u>481</u>		
chAb25	<u>SEQ ID NO: 486, 488,</u> <u>490</u>	72,88	25,39
	<u>SEQ ID NO: 495, 497,</u> <u>499</u>		
chAb20	<u>SEQ ID NO: 396, 398,</u> <u>400</u>	72,96	8,82
	<u>SEQ ID NO: 405, 407,</u> <u>409</u>		
chAb30	<u>SEQ ID NO: 576, 578,</u> <u>580</u>	76,08	23,17

	<u>SEQ ID NO: 585, 587,</u> <u>589</u>		
chAb29	<u>SEQ ID NO: 558, 560,</u> <u>562</u>	67,83	12,72
	<u>SEQ ID NO: 567, 569,</u> <u>571</u>		
chAb31	<u>SEQ ID NO: 594, 596,</u> <u>598</u>	60,74	37,86
	<u>SEQ ID NO: 603, 605,</u> <u>607</u>		

Пример 5: Характеристика антител: непрямая цитотоксичность ADC

1. Способы

Клетки GAXC031 инкубировали с выбранными химерными антителами (первичное антитело) и конъюгированным с vc-MMAF против IgG человека (вторичное антитело) для оценки эффективности цитотоксичности антител, индуцированной конъюгацией антитело-лекарственное средство. Способ описывают следующим образом:

- а. Клетки GAXC031 высевали по 2000 клеток/лунку в 65 мкл среды для анализа;
- б. Клетки обрабатывали первичным антителом с помощью серии разведений в 25 мкл среды для анализа в соответствии со схемой дизайна на следующий день (конечная начальная рабочая концентрация 100 нМ, предварительное разведение 1:5), затем добавляли 10 мкл вторичного антитела (конечная рабочая концентрация: 2 мкг/мл);
- в. Продолжали культивирование в течение 120 часов; и
- г. Измеряли жизнеспособность клеток через 120 часов в соответствии с руководством по Celltiter Glo.

2. Результаты

Все антитела согласно настоящему изобретению продемонстрировали активный не прямой эффект ADC на клетки GAXC031 с более высоким максимальным

уничтожением клеток (максимальным ингибированием роста) и более низким IC₅₀ по сравнению с эталонным антителом (т. е. IMAV362) (см. таблицу 12 и фигуру 6).

Таблица 12. Макс. % ингибирования роста GAXC031 и IC₅₀ непрямой цитотоксичности ADC

Идентификатор образцов	SEQ ID NO VH-CDR 1, VH-CDR 2, VH-CDR 3 (верхняя) и VL-CDR 1, VL-CDR 2, VL-CDR 3	IC ₅₀ (нМ)	Максимальное ингибирование %
IMAV362	<u>SEQ ID NO: 2, 4, 6</u>	4,75	81,80
	<u>SEQ ID NO: 10, 12, 14</u>		
chAb06	<u>SEQ ID NO: 108, 110, 112</u>	0,61	91,78
	<u>SEQ ID NO: 117, 119, 121</u>		
chAb10	<u>SEQ ID NO: 216, 218, 220</u>	0,24	92,83
	<u>SEQ ID NO: 225, 227, 229</u>		
chAb15	<u>SEQ ID NO: 306, 308, 310</u>	0,38	92,43
	<u>SEQ ID NO: 315, 317, 319</u>		
chAb17	<u>SEQ ID NO: 342, 344, 346</u>	0,88	92,40
	<u>SEQ ID NO: 351, 353, 355</u>		
chAb05	<u>SEQ ID NO: 90, 92, 94</u>	0,99	92,28

	<u>SEQ ID NO: 99,</u> <u>101, 103</u>		
chAb08	<u>SEQ ID NO: 144,</u> <u>146, 148</u>	0,45	92,52
	<u>SEQ ID NO: 153,</u> <u>155, 157</u>		
chAb11	<u>SEQ ID NO: 234,</u> <u>236, 238</u>	0,87	93,49
	<u>SEQ ID NO: 243,</u> <u>245, 247</u>		
chAb18	<u>SEQ ID NO: 360,</u> <u>362, 364</u>	1,58	90,72
	<u>SEQ ID NO: 369,</u> <u>371, 373</u>		
chAb24	<u>SEQ ID NO: 468,</u> <u>470, 472</u>	0,85	92,72
	<u>SEQ ID NO: 477,</u> <u>479, 481</u>		
chAb25	<u>SEQ ID NO: 486,</u> <u>488, 490</u>	0,86	92,91
	<u>SEQ ID NO: 495,</u> <u>497, 499</u>		
chAb20	<u>SEQ ID NO: 396,</u> <u>398, 400</u>	0,47	92,83
	<u>SEQ ID NO: 405,</u> <u>407, 409</u>		
chAb30	<u>SEQ ID NO: 576,</u> <u>578, 580</u>	1,58	92,38
	<u>SEQ ID NO: 585,</u> <u>587, 589</u>		
chAb29	<u>SEQ ID NO: 558,</u> <u>560, 562</u>	0,91	93,53

	<u>SEQ ID NO: 567,</u> <u>569, 571</u>		
chAb31	<u>SEQ ID NO: 594,</u> <u>596, 598</u>	2,35	91,69
	<u>SEQ ID NO: 603,</u> <u>605, 607</u>		

Пример 6: Гуманизация антител

Для гуманизации антител были выбраны ведущие кандидаты Ab15, Ab10 и Ab17.

Вкратце, последовательности мышиных антител анализировали, а затем проводили

- 1) Моделирование доменов VH и VL антител мыши;
- 2) Выравнивание с рядом предпочтительных последовательностей зародышевой линии человека;
- 3) Оценку конфликтов между нечеловеческими CDR и человеческими FR и дизайн обратных мутаций для предотвращения потери аффинности в конечных продуктах;
- 4) Прививку CDR на предпочтительные каркасы зародышевой линии;
- 5) Получали примерно 5 различных гуманизированных последовательностей, проводили клонирование и мелкосерийную выработку всех гуманизированных вариантов и химер в системе экспрессии млекопитающих;

Окончательно полученные тяжелые цепи и легкие цепи гуманизированных последовательностей перечислены ниже (аминокислоты, выделенные красным цветом, относятся к аминокислотам CDR):

>Ab15 HM-VH1

EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPEKRLEWVATIVGGGGYTTYLD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARMGLTQRNALDYWGQGTLLITVSS (SEQ
ID NO: 704)

>Ab15 HM-VH2

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPEKRLEWVATIVGGGGYTTYLD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARMGLTQRNALDYWGQGTITVSS (SEQ
ID NO: 705)

>Ab15 HM-VH3

EVMLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPEKRLEWVATIVGGGGYTTYLD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTALYYCARMGLTQRNALDYWGQGTITVSS (SEQ
ID NO: 706)

>Ab15-HM-VH-N1

EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPGKRLEWVATIVGGGGYTTYLD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGLTQRNALDYWGQGTSITVSS (SEQ
ID NO: 707)

>Ab15 HM-VL1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDHTYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
708)

>Ab15 HM-VL2

DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCKSSQSLFNSGNQKNYLAWYLQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGFGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQNDHTYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
709)

>Ab15-HM-VL-N1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDHTYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
710)

>Ab10-HM-VH2

EVMLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPEKRLEWVATISVIGGNTYYVD
SVKGRFTISRDKAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARLGQTQRNAMDYWGQGTIVTVSS (SEQ
ID NO: 711)

>Ab10-HM-VH3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPEKRLEWVATISVIGGNTYYVD
SVKGRFTISRDKAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARLGQTQRNAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO: 712)

>Ab10-HM-VH4

EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISVIGGNTYYVD
SVKGRFTISRDKAKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARLGQTQRNAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO: 713)

>Ab10-HM-VH-N1

EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPGKRLEWVATISVIGGNTYYVD
SVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGQTQRNAMDYWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO: 714)

>Ab10 HM-VL1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
715)

>Ab10 HM-VL2

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPRKLIIYGASTRES
GIPARFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
716)

>Ab10-HM-VL-N1

DIVMTQSPDSLAVSAGERATMNCKSSQSLNLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:
717)

>Ab17 HM-VH1

QVQLKESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKGLEWLGEIWTGGGTNYNSA
LKSRVSISKDNSKSQVFLKLSSVQAADTARYYCGRLSYGNSLDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID
NO: 718)

>Ab17 HM-VH2

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTSYAISWVRQPAGKGLEWLGEIWTGGGTNYNSA
LKS RVSI SKDNSKSQVFLKLSSVQAADTARYYCGRLSYGNSLDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID
NO: 719)

>Ab17 HM-VH3

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKGLEWLGEEIWTGGGTNYNPA
LKS RVSI SKDNSKSQVFLKLSSVTAADTARYYCGRLSYGNSLDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID
NO: 720)

>Ab17 HM-VH3-CDR2

EIWTGGGTNYNPALKS (SEQ ID NO: 726)

>Ab17 HM-VH5

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLTSYAISWVRQPAGKGLEWLGEIWTGGGTNYNSA
LKS RVSI SKDNSKSQVFLKLSSVTAADTARYYCGRLSYGNSLDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID
NO: 721)

>Ab17 HM-VH1-N1

QVQLQESGPGLVKPSETLSTCTVSGFSLTSYAISWVRQPPGKGLEWIGEEIWTGGGTNYNSS
LKS RVTI SKDNSKSQVSLKLSSVQAADTARYYCGRLSYGNSLDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID
NO: 722)

>Ab17 HM-VH1-N1-CDR2

EIWTGGGTNYNSSLKS (SEQ ID NO: 727)

>Ab17 HM-VL1

DIVMTQSPDSLTVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNNFIYPLTFGPGTKLEIK (SEQ ID NO:
723)

>Ab17 HM-VL2

DIVMTQSPSLPVTLGEPASISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQNNFIYPLTFGPGTKLEIK (SEQ ID NO:
724)

>Ab17 HM-VL1-N

DIVMTQSPDSTTVLLGERATINCKSSQSL~~LN~~SGNQKNYLA~~AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES~~
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS~~SLQAEDVAVYYCQNNFIYPLTFGPGTKLEIK~~ (SEQ ID NO:
 725)

>Ab17 HM-VL1-N-CDR1

KSSQSL~~LN~~SGNQKNYLA (SEQ ID NO: 728)

1. Аффинность связывания в отношении клеток (GAXC031)

Экспрессировали гуманизированные антитела с различной комбинацией легких и тяжелых цепей. Аффинность на основе клеток тестировали с использованием клеток GAXC031. Некоторые гуманизированные антитела показали равную или слегка сниженную аффинность в отношении клеток GAXC031, как показано на фигуре 7.

2. Аффинность связывания на основе клеток (KatoIII и SNU 620)

Клетки KatoIII и SNU620, экспрессирующие очень низкий уровень клаудина 18.2, тестировали на аффинность связывания с Ab15, Ab10 и Ab17. Вкратце, эти клетки рака желудка собирали и дважды промывали 1х буфером PBS, а затем инкубировали с mAb согласно настоящему описанию в серии концентраций в течение 1 часа. Образцы дважды промывали и инкубировали с меченым FITC вторичным антителом для последующего анализа методом проточной цитометрии.

Эти две клеточные линии рака желудка фактически экспрессировали относительно низкие уровни клаудина 18.2, который был обнаружен с помощью антител согласно настоящему изобретению, в то время как референсное антитело IMAV 362 с трудом обнаруживало указанный сигнал (см. фиг. 8). Опять же, mAb Ab15 продемонстрировало наивысшую аффинность.

3. Анализ SPR для ведущих кандидатов

Аффинность антител с VLP-Клаудин 18.2-биотином определяли с помощью BIAcore 8K (GE Healthcare). 200 мкг/мл VLP-клаудин 18.2-биотина иммобилизовали на сенсорном чипе Series S Sensor Chip SA при скорости потока 10 мкл/мин в течение 120 с до достижения уровня иммобилизации примерно 1200 RU. Антитела вводили со

скоростью 30 мкл/мин при комнатной температуре с градиентом концентрации (1,56~50 нМ). Время контакта было установлено на 180 с, а время диссоциации — на 400 с. В конце каждого цикла вводили 10 мМ глицина, pH 1,5, для удаления тестируемого антитела с поверхности. Наконец, рассчитывали кинетику связывания с использованием программного обеспечения BIAcore Insight Evaluation Software, и модель связывания 1:1 была использована для подбора кривой.

Как показано на фигуре 9, гуманизированное Ab15 (VH3xVLN1), гуманизированное Ab15 (VHN1xVL2), гуманизированное Ab10 (VHN1xVLN1), гуманизированное Ab10 (VH3xVLN1), гуманизированное Ab17 (VH5xVLN1) и гуманизированное Ab17 (VH1xVLN1) имеют KD $7,07 \times 10^{-13}$, $9,40 \times 10^{-12}$, $1,39 \times 10^{-10}$, $4,41 \times 10^{-10}$, $4,60 \times 10^{-10}$ и $4,95 \times 10^{-10}$, соответственно.

Пример 7: анализ эффективности конъюгатов антитело-лекарственное средство

1. Анализ эффективности *in vitro* (включая эффективность ADC)

Опухолевые клетки-мишени высевали по 2000 клеток/лунку в 75 мкл среды для анализа, а затем обрабатывали конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) в форме антитела-vc-MMAE с последовательным разведением в 25 мкл аналитической среды в соответствии со схемой дизайна на следующий день (окончательная начальная рабочая концентрация 100 нМ, серийное разведение 1:5). Клетки продолжали культивировать в течение 120 часов и через 120 часов измеряли жизнеспособность клеток в соответствии с руководством по Celltiter Glo.

Клетки CHOK1, сверхэкспрессирующие клаудин 18.2 человека (HOK1-hClaudin18.2) и клетки GAXC031 обрабатывали ADC, полученными из химерных антител Ab15, Ab10 и Ab17 (или их гуманизированными последовательностями), и человеческим IgG1-vc-MMAE. Измеряли процент выживания после 120 часов инкубирования.

Цитотоксичность можно было обнаружить, когда клетки-мишени инкубировали с ADC, полученными из антитела согласно настоящему изобретению, конъюгирующего

vc-MMAE. Субнанолярную или нанолярную эффективность можно было наблюдать для анализа цитотоксичности *in vitro* (см. фигуру 10).

2. Оценка эффективности *in vivo*:

1) Исследование mAbs *in vivo*

Вкратце, клетки MC38-hClaudin18.2 инокулировали мышам C57BL/6. Мышей случайным образом разделяли на 10 групп, когда объем опухоли составлял примерно 100 мм³. Антитела (Ab15, Ab10, Ab17, 6E8A2, 25G1F4, 51E3H5 и референсное антитело IMAB362) с Fc mIgG2a вводили мышам в дозе 5 мг/кг.

По сравнению с контрольной группой PBS большинство введенных антител показали ингибирование роста опухоли. Ингибирование роста опухоли (TGI) находилось в диапазоне от 15,3% до 38,6%, при этом Ab15 показало наилучшую эффективность при монотерапии (см. фигуру 11A). Все введенные антитела не проявляли токсичности для мышей, поскольку масса тела не снижалась (см. фигуру 11B).

2) Исследование эффективности ADC *in vivo*

В первую очередь Ab10-vc-MMAF тестировали на эффективность *in vivo*. Вкратце, клетки GAXC031 инокулировали бестимусным мышам BABL/c (самкам, 6-8 недель). Когда средний объем опухоли достиг примерно 120 мм³, лекарственные средства ADC (Ab10-vc-MMAF и IMAB362-vc-MMAF), а также контрольные вещества (носитель PBS и hIgG-vc-MMAF) вводили посредством внутривенной инъекции в таком виде, чтобы они доставлялись с частотой каждые 2 недели (Q2W) 2 раза. Объем опухоли определяли два раза в неделю в течение 3 недель.

Определяли TGI и массу тела, а также показатели выживаемости.

По сравнению с контрольным и референсным антителом ADC, Ab10-vc-MMAF показал более сильную эффективность, а в группе с высокой дозой (10 мг/кг) наблюдалась полная регрессия опухоли (см. фигуру 12A и 12C-12J). Кривая выживаемости показала, что мыши в группах, получавших ADC, жили дольше (см. фигуру 12K). Опять же, лекарственные средства ADC не проявляли какой-либо токсичности, поскольку масса тела не снижалась (см. фигуру 12B).

3) Исследование эффективности *in vivo* гуманизированного антитела ADC (vc-MMAE в качестве линкера-нагрузки).

Клетки GAXC031 инокулировали бестимусным мышам BABL/c (самкам, 6-8 недель). Когда средний объем опухоли достигал примерно 120 мм³, лекарственные средства ADC (Ab15, Ab10, Ab17, конъюгированные с vc-MMAE, и их гуманизированные антитела), а также контроль в виде носителя PBS вводили посредством внутривенной инъекции только один раз в дозе 3 мг/кг. Объем опухоли определяли два раза в неделю в течение 3 недель. Определяли TGI и массу тела, а также показатели выживаемости.

Все ADC были достаточно активными в отношении модели GAXC031. Регрессию опухоли можно наблюдать в большинстве групп лечения ADC (см. фигуру 13).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с клаудином-18 (CLDN 18), где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплиментарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 20, 22, 27, 29, 31, 36, 38, 40, 45, 47, 49, 54, 56, 58, 63, 65, 67, 72, 74, 81, 83, 85, 90, 92, 94, 99, 101, 103, 108, 110, 112, 117, 119, 121, 126, 128, 130, 135, 137, 139, 144, 146, 148, 153, 155, 157, 163, 165, 167, 172, 174, 176, 181, 183, 185, 190, 192, 194, 198, 200, 202, 207, 209, 211, 216, 218, 220, 225, 227, 229, 234, 236, 238, 243, 245, 247, 252, 254, 256, 261, 263, 265, 270, 272, 274, 279, 281, 283, 288, 290, 292, 297, 299, 301, 306, 308, 310, 315, 317, 319, 324, 326, 328, 333, 335, 337, 342, 344, 346, 351, 353, 355, 360, 362, 364, 369, 371, 373, 378, 380, 382, 387, 389, 391, 396, 398, 400, 405, 407, 409, 414, 416, 418, 423, 425, 427, 432, 434, 436, 441, 443, 445, 450, 452, 454, 459, 461, 463, 468, 470, 472, 477, 479, 481, 486, 488, 490, 495, 497, 499, 504, 506, 508, 513, 515, 517, 522, 524, 526, 531, 533, 535, 540, 542, 544, 549, 551, 553, 558, 560, 562, 567, 569, 571, 576, 578, 580, 585, 587, 589, 594, 596, 598, 603, 605, 607, 612, 614, 616, 621, 623, 625, 630, 632, 634, 639, 641, 643, 648, 650, 652, 657, 659, 661, 666, 668, 670, 675, 677, 679, 684, 686, 688, 693, 695, 726, 727, 728 и 697.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащее (ий) переменную область тяжелой цепи, содержащую 1, 2 или 3 VH-CDR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 20, 22, 36, 38, 40, 54, 56, 58, 72, 74, 90, 92, 94, 108, 110, 112, 126, 128, 130, 144, 146, 148, 163, 165, 167, 181, 183, 185, 198, 200, 202, 216, 218, 220, 234, 236, 238, 252, 254, 256, 270, 272, 274, 288, 290, 292, 306, 308, 310, 324, 326, 328, 342, 344, 346, 360, 362, 364, 378, 380, 382, 396, 398, 400, 414, 416, 418, 432, 434, 436, 450, 452, 454, 468, 470, 472, 486, 488, 490, 504, 506, 508, 522, 524, 526, 540, 542, 544, 558, 560, 562, 576, 578, 580, 594, 596, 598, 612, 614, 616, 630, 632, 634, 648, 650, 652, 666, 668, 670, 684, 686, 726, 727 и 688.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, дополнительно содержащее (ий) переменную область легкой цепи (VL), содержащую 1, 2 или 3 VL-

CDR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29, 31, 45, 47, 49, 63, 65, 67, 81, 83, 85, 99, 101, 103, 117, 119, 121, 135, 137, 139, 153, 155, 157, 172, 174, 176, 190, 192, 194, 207, 209, 211, 225, 227, 229, 243, 245, 247, 261, 263, 265, 279, 281, 283, 297, 299, 301, 315, 317, 319, 333, 335, 337, 351, 353, 355, 369, 371, 373, 387, 389, 391, 405, 407, 409, 423, 425, 427, 441, 443, 445, 459, 461, 463, 477, 479, 481, 495, 497, 499, 513, 515, 517, 531, 533, 535, 549, 551, 553, 567, 569, 571, 585, 587, 589, 603, 605, 607, 621, 623, 625, 639, 641, 643, 657, 659, 661, 675, 677, 679, 693, 695, 728 и 697.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащие:

- i. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY, SEQ ID NO: 18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 163, 181, 198, 216, 234, 252, 270, 288, 206, 324, 342, 360, 378, 396, 414, 432, 450, 468, 486, 504, 522, 540, 558, 576, 594, 612, 630, 648, 666 и 684;
- ii. VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 38, 56, 74, 92, 110, 128, 146, 165, 183, 200, 218, 236, 254, 272, 290, 308, 326, 344, 362, 380, 398, 416, 434, 452, 470, 488, 506, 524, 542, 560, 578, 596, 614, 632, 650, 668, 726, 727 и 686; и
- iii. VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GDY и SEQ ID NO: 22, 40, 58, 94, 112, 130, 148, 167, 185, 202, 220, 238, 256, 274, 292, 310, 328, 346, 364, 382, 400, 418, 436, 454, 472, 490, 508, 526, 544, 562, 580, 598, 616, 634, 652, 670 и 688.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащие:

- i. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 45, 63, 81, 99, 117, 135, 153, 172, 190, 207, 225, 243, 261, 279, 297, 315, 333, 351, 369, 387, 405, 423, 441, 459, 477, 495, 513, 531, 549, 567, 585, 603, 621, 639, 657, 675, 728 и 693;
- ii. VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 47, 65, 83, 101, 119, 137, 155, 174, 192, 209, 227, 245,

263, 281, 299, 317, 335, 353, 371, 389, 407, 425, 443, 461, 479, 497, 515, 533, 551, 569, 587, 605, 623, 641, 659, 677 и 695; и

iii. VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, 49, 67, 85, 103, 121, 139, 157, 176, 194, 211, 229, 247, 265, 283, 301, 319, 337, 355, 373, 391, 409, 427, 445, 463, 481, 499, 517, 535, 553, 571, 589, 607, 625, 643, 661, 679 и 697.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, содержащие:

- i. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
- ii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;
- iii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;
- iv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность GDY;
- v. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94;
- vi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112;
- vii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130;

- xviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328;
- xix. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 344, 726 и 727, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346;
- xx. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 364;
- xxi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 378, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 380, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 382;
- xxii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 396, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 398, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 400;
- xxiii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 414, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 416, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 418;
- xxiv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 432, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 434, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 436;
- xxv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 450, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 452, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 454;
- xxvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 468, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 470, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 472;

- [illegible]

xxxvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 666, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 668, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 670; или

xxxviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 684, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 686, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 688.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, дополнительно содержащее (ий):

- i. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;
- ii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;
- iii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;
- iv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; или
- v. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;
- vi. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121;
- vii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139;

- xviii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337;
- xix. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 351 или SEQ ID NO: 728, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 353, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 355;
- xx. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 369, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 373;
- xxi. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 387, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 389, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 391;
- xxii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 405, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 407, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 409; или
- xxiii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 423, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 427;
- xxiv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 441, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 443, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 445;
- xxv. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 459, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 461, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 463;
- xxvi. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 477, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 481;

xxxvii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 675, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 677, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 679; или

xxxviii. VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 693, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 695, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 697.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, содержащее (ий):

- i. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;
- ii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;
- iii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67;
- iv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность GDY, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, VL-CDR 2, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85;

- [illegible]

- [illegible]

- имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 263, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 265;
- xv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 270, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 272, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 274, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 279, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 281, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 283;
- xvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 288, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 290, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 292, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 297, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 299, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 301;
- xvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 306, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 308, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 310, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 315, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 317, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 319;
- xviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 326, 726 и 727, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333 или 728, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 337;
- xix. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346, VL-CDR 1,

xxvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 468, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 470, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 472, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 477, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 479, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 481;

xxviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 504, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 506, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 508, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 513, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 515, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 517;

xxix. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 522, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 524, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 526, VL-CDR 1,

xxxі. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 558, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 562, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 567, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 569, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 571;

xxxiii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 594, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 596, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 598, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 603, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 605, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 607;

xxxiv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 612, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 614, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 616, VL-CDR 1,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 621, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 623, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 625;

xxxv. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 630, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 632, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 634, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 639, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 641, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 643;

xxxvi. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 648, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 650, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 652, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 657, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 659, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 661;

xxxvii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 666, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 668, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 670, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 675, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 677, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 679; или

xxxviii. VH-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 684, VH-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 686, и VH-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 688, VL-CDR 1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 693, VL-CDR 2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 695, и VL-CDR 3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 697.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, содержащее (ий) пару последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и пару вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:

25/34, SEQ ID NO: 43/52, SEQ ID NO: 61/70, SEQ ID NO: 79/88, SEQ ID NO: 97/106, SEQ ID NO: 115/124, SEQ ID NO: 133/142, SEQ ID NO: 151/160, SEQ ID NO: 205/214, SEQ ID NO: 223/232, SEQ ID NO: 241/250, SEQ ID NO: 259/268, SEQ ID NO: 277/286, SEQ ID NO: 295/304, SEQ ID NO: 313/322, SEQ ID NO: 331/340, SEQ ID NO: 349/358, SEQ ID NO: 367/376, SEQ ID NO: 385/394, SEQ ID NO: 403/412, SEQ ID NO: 421/430, SEQ ID NO: 439/448, SEQ ID NO: 457/466, SEQ ID NO: 475/484, SEQ ID NO: 493/502, SEQ ID NO: 511/520, SEQ ID NO: 529/538, SEQ ID NO: 547/556, SEQ ID NO: 565/574, SEQ ID NO: 583/592, SEQ ID NO: 601/610, SEQ ID NO: 619/628, SEQ ID NO: 637/646, SEQ ID NO: 655/664, SEQ ID NO: 673/682, SEQ ID NO: 691/161, SEQ ID NO: 170/179, SEQ ID NO: 188/76, или пару гомологичных им последовательностей, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности и сохраняющую аффинность специфического связывания с CLDN 18.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, содержащее (ий):

- а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 704, SEQ ID NO: 705, SEQ ID NO: 706 и SEQ ID NO: 707, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 708, SEQ ID NO: 709 и SEQ ID NO: 710; или
- б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 711, SEQ ID NO: 712, SEQ ID NO: 713 и SEQ ID NO: 714, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 715, SEQ ID NO: 716 и SEQ ID NO: 717; или
- в) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 719, SEQ ID NO: 720, SEQ ID NO: 721 и SEQ ID NO: 722, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 723, SEQ ID NO: 724 и SEQ ID NO: 725.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, дополнительно содержащее (ий) одну или более замен или модификаций аминокислотных остатков, при которых сохраняется аффинность специфического связывания с CLDN 18.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где по меньшей мере одна из замен или модификаций находится в одной или более последовательностях CDR и/или в одной или более не относящихся к CDR последовательностях вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащее (ий) одну или более замен на неприродные аминокислоты (NNAА).

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, где NNAА способны к конъюгации.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, распознающее (ий) тот же сайт антигенной детерминанты, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-14.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-15, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, поликлональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифичное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, меченное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, бивалентное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антиидиотипическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-16, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой

камелизированное однодоменное антитело, диатело, scFv, димер scFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', фрагмент Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, стабилизированное дисульфидом (ds) диатело, наноантитело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

18. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, дополнительно содержащее константную область иммуноглобулина.

19. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где указанная константная область иммуноглобулина представляет собой константную область легкой цепи λ , легкой цепи κ , тяжелой цепи $\gamma 1$, тяжелой цепи $\gamma 2$, тяжелой цепи $\gamma 3$ или тяжелой цепи $\gamma 4$.

20. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой изотип IgG1 человека.

21. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где указанная константная область иммуноглобулина содержит область Fc, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 700-703.

22. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается с белком CLDN 18.2.

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-21, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается как с белком CLDN 18.1, так и с белком CLDN 18.2.

24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, где аффинность связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с клеткой, экспрессирующей CLDN 18.2, превышает или сопоставима со значением для референсного антитела.

25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, где максимальная MFI антитела или антигенсвязывающего фрагмента с клеткой, экспрессирующей CLDN 18.2, превышает значение для референсного антитела.

26. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24 или 25, где указанное референсное антитело представляет собой IMAB362.

27. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 24-26, где указанная экспрессия CLDN 18.2 на поверхности клетки низка.

28. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 24-26, где указанную аффинность связывания определяют с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или иммуноферментного анализа (ELISA).

29. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-28, где указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком CLDN 18.2 с EC_{50} менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ или менее чем приблизительно 2 нМ.

30. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, связанное с одним или более конъюгатными фрагментами.

31. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, где указанный конъюгатный фрагмент содержит активный агент, радиоактивный изотоп, детектируемую метку, фрагмент, модифицирующий фармакокинетику, или очищающий фрагмент.

32. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, где указанный конъюгатный фрагмент ковалентно присоединен либо непосредственно, либо через линкер.

33. Химерный антигенный рецептор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, трансмембранную область и внутриклеточную сигнальную область.

34. Химерный антигенный рецептор по п. 33, где указанная внутриклеточная сигнальная область выбрана из группы, состоящей из последовательностей внутриклеточных сигнальных областей CD3, FcγRI, CD27, CD28, CD137, CD134, MyD88, CD40, CD278, TLRs или их комбинации.

35. Химерный антигенный рецептор по п. 33 или 34, где указанная трансмембранная область содержит трансмембранную область CD3, CD4, CD8 или CD28.

36. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32 или химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35.

37. Выделенный полинуклеотид по п. 36, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 24, 42, 60, 78, 96, 114, 132, 150, 204, 222, 240, 258, 276, 294, 312, 330, 348, 366, 384, 402, 420, 438, 456, 474, 492, 510, 528, 546, 564, 582, 600, 618, 636, 654, 672, 690, 169, 187, или гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности.

38. Выделенный полинуклеотид по п. 37, дополнительно содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 33, 51, 69, 87, 105, 123, 141, 159, 213, 231, 249, 267, 285, 303, 321, 339, 357, 375, 393, 411, 429, 447, 465, 483, 501, 519, 537, 555, 573, 591, 609, 627, 645, 663, 681, 699, 178, 196, или гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности.

39. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 37-38.

40. Экспрессионная система хозяина, содержащая вектор по п. 39 или имеющая полинуклеотид по любому из пп. 37-38, интегрированный в ее геном.

41. Экспрессионная система хозяина по п. 40, представляющая собой микроорганизм, дрожжи или клетку млекопитающего, где указанный микроорганизм выбран из группы, состоящей из *E. coli* и *B. subtilis*, где указанные дрожжи представляют собой *Saccharomyces*, и где указанная клетка млекопитающего выбрана из группы, состоящей из клеток COS, CHO-S, CHO-K1, HEK-293 и 3T3.

42. Вирус, содержащий вектор по п. 39.

43. Способ экспрессирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-32 или химерного антигенного рецептора по любому из пп. 33-35, включающий культивирование экспрессионной системы хозяина по п. 40 или 41 в условиях, при которых экспрессируется антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32 или химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35.

44. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, связанное с одним или более терапевтическими агентами, непосредственно или через линкер.

45. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 44, где указанный один или более терапевтических агентов включает цитотоксический агент, такой как монометилауристатин F (MMAF).

46. Модифицированная иммунная клетка, нацеленная на клетки, экспрессирующие CLDN 18.2, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32 или химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35, полинуклеотид по любому из пп. 35-37, вектор по п. 38 или вирус по п. 42.

47. Модифицированная иммунная клетка по п. 46, где клетки, экспрессирующие CLDN 18.2, выбраны из группы, состоящей из клеток рака желудка, клеток рака поджелудочной железы, клеток рака пищевода, клеток рака легких, клеток рака желчного пузыря, колоректального рака и клеток рака печени.

48. Модифицированная иммунная клетка по п. 46 или 47, где указанная иммунная клетка представляет собой Т-лимфоцит, NK-клетку, моноцит, макрофаг или NKT-лимфоцит.

49. Модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 46-48, дополнительно обладающая одним или более из признаков, выбранных из группы, состоящей из следующего:

- i. несет кодирующую последовательность для экзогенного цитокина,
- ii. экспрессирует другой химерный антигенный рецептор или их комбинацию,
- iii. экспрессирует хемокиновый рецептор,
- iv. экспрессирует миРНК, которая уменьшает экспрессию ингибитора иммунной контрольной точки или белка, который блокирует ингибитор иммунной контрольной точки,
- v. имеет нокаутированный эндогенный ингибитор иммунной контрольной точки
- vi. экспрессирует секретируемое антитело sc-fv
- vii. экспрессирует костимулирующий белок

viii.экспрессирует защитный переключатель.

50. Модифицированная иммунная клетка по п. 49, где указанный ингибитор контрольной точки выбран из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–32, химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33–35, полинуклеотид по любому из пп. 36–38, вектор по п. 39, вирус по п. 42 или модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 46-50 и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

52. Фармацевтическая композиция по п. 51, где указанные один или более фармацевтически приемлемых носителей выбраны из группы, состоящей из фармацевтически приемлемой жидкости, геля, твердых носителей, водных носителей, неводных носителей, противомикробных агентов, изотонических агентов, буферов, антиоксидантов, анестетиков, суспендирующих/диспергирующих агентов, секвестрирующих или хелатирующих агентов, разбавителей, адъювантов, эксципиентов и нетоксичных вспомогательных веществ.

53. Фармацевтическая композиция по п. 51 или 52, дополнительно содержащая один или более терапевтических агентов.

54. Фармацевтическая композиция по п. 44 или 53, где указанные один или более терапевтических агентов выбраны из группы, состоящей из амрубицина, апатиниба мезилата, атрасентана, батабулина, кальцитриола, капецитабина, циленгитида, дазатиниба, декатаниба, эдотекарина, энзастаурина, эрлотиниба, эверолимуса, гиматекана, госсипола, ипилимумаба, лонафарниба, лукантона, нейрадиба, нолатрекседа, облимерсена, олапариба, офатумумаба, ореговомаба, панитумумаба, пазопанибрубитекана, регорафениба, талампанела, тегафура, темсиролимуса, тесмилифена, тетрандрина, тицилимумаба, траметиниба, трабектедина, вандетаниба, витеспана, занолимумаба, золендроната, гистрелина, азацитидина, дексразоксана, алемтузумаба, леналидомида, гемтузумаба, кетоконазола, азотистого иприта, ибритумумаба, тиуксетана, децитабина, гексаметилмеламина, бексаротена, тозитумумаба, триоксида мышьяка, эдитроната, циклоспорина, аспарагиназы Эдвина,

эпирубицина, оксалиплатина, антитела к PD1, антитела к PDL1, антитела к HER2, ADC к HER2, 5-фторурацила и стронция 89.

55. Набор, содержащий:

емкость и фармацевтическую композицию по любому из пп. 51-54; или
емкость и антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35, полинуклеотид по любому из пп. 36-38, вектор по п. 39, вирус по п. 42 или модифицированную иммунную клетку по любому из пп. 46-50.

56. Способ лечения или предупреждения связанного с CLDN состояния у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-32, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 33-35, полинуклеотида по любому из пп. 36-38, вектора по п. 39, вируса по п. 42 или модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 46-50.

57. Способ по п. 56, где связанное с CLDN состояние представляет собой раковое состояние.

58. Способ по п. 57, где указанное раковое состояние выбрано из группы, состоящей из рака легкого (например мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), аденокарциномы легкого или плоскоклеточного рака легкого), желудочного рака или рака желудка (например, рака желудочно-кишечного тракта), рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы), плоскоклеточного рака, рака брюшины, опухоли головного мозга (например, глиобластомы/мультиформной глиобластомы (GBM), неглиобластомной опухоли головного мозга или менингиомы), глиомы (например, эпендимомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы или смешанной глиомы, такой как олигоастроцитомы), рака шейки матки, рака яичника, рака печени (например, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы/гепатомы или карциномы печени), рака мочевого пузыря (например, уротелиального рака), рака молочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, рака эндометрия или матки, карциномы слюнных желез, рака почки или почечного рака (например,

рабдоидной опухоли почки), рака предстательной железы, рака вульвы, рака полового члена, рака анального канала (например, анальной плоскоклеточной карциномы), рака щитовидной железы, рака головы и шеи (например, рака носоглотки), рака кожи (например, меланомы или плоскоклеточного рака), остеосаркомы, саркомы Юинга, хондросаркомы, саркомы мягких тканей (например, рабдомиосаркомы, фибросаркомы, саркомы Капоши), карциноидного рака, рака глаза (например, ретинобластомы), мезотелиомы, лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (например, острого лимфоцитарного/лимфобластного лейкоза (ALL) как Т-клеточного происхождения, так и В-клеточного происхождения, хронического лимфобластного/лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелогенного/миелобластного лейкоза (AML), включая тучноклеточный лейкоз, хронического миелогенного/миелоцитарного/миелобластного лейкоза (CMML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы, хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), фолликулярной лимфомы (FL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLCL), мантийноклеточной лимфомы (MCL), лимфомы Беркитта (BL), грибовидного микоза, синдрома Сезари, кожной Т-клеточной лимфомы, опухоли тучных клеток, медуллобластомы, нефробластомы, солитарной плазмоцитомы, миелодиспластического синдрома, хронического и нехронического миелопролиферативного расстройства, опухоли центральной нервной системы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, рака желчного пузыря, идиопатического миелфиброза и рака у детей, такого как детская саркома (например, нейробластома, рабдомиосаркома и остеосаркома).

59. Способ по любому из пп. 56-58, где введение осуществляют парентеральным путем, включающим подкожную, внутрибрюшинную, внутривенную, внутримышечную или внутрикожную инъекцию; или непарентеральным путем, включающим трансдермальный, пероральный, интраназальный, внутриглазной, подъязычный, ректальный или местный.

60. Способ по любому из пп. 56-59, где указанный способ дополнительно включает введение нуждающемуся в этом субъекту дополнительного терапевтического агента.

61. Способ по п. 60, где указанный дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из: активного агента, визуализирующего агента, цитотоксического агента и ингибитора ангиогенеза, ингибитора киназы, агониста костимулирующей молекулы, блокатора молекулы совместного ингибирования, блокатора молекулы адгезии, антитела к цитокину или его функционального фрагмента, детектируемой метки или репортера, противомикробного средства, агента редактирования генов, бета-агониста, ингибитора вирусной РНК, ингибитора полимеразы, интерферона и микроРНК.

62. Способ по п. 60 или 61, где указанный дополнительный терапевтический агент вводят нуждающемуся субъекту перед введением композиции по любому из пп. 51-54, после введения композиции по любому из пп. 51-54, и/или одновременно с композицией по любому из пп. 51-54.

63. Способ диагностики связанного с CLDN состояния, включающий обнаружение CLDN с применением антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-32, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 33-35, полинуклеотида по любому из пп. 36-38, вектора по п. 39, вируса по п. 42, модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 46-50, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтической композиции по любому из пп. 49-52 или набора по п. 55.

64. Способ по п. 63, где CLDN представляет собой CLDN 18.2 или CLDN 18.1.

65. Способ по п. 63, где указанное состояние выбрано из группы, состоящей из рака желудка, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака легкого, рака желчного пузыря, колоректального рака и рака печени.

66. Способ индукции гибели клетки, экспрессирующей CLDN 18.2, включающий приведение клетки, экспрессирующей CLDN 18.2, в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-32, химерным антигенным рецептором по любому из пп. 33-35, полинуклеотидом по любому из пп. 36-38, вектором

по п. 39, вирусом по п. 42, модифицированной иммунной клеткой по любому из пп. 46-50, конъюгатом антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтической композицией по любому из пп. 49-52 или набором по п. 55.

67. Способ по п. 66, где клетку приводят в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-32, химерным антигенным рецептором по любому из пп. 33-35, полинуклеотидом по любому из пп. 36-38, вектором по п. 39, вирусом по п. 42, модифицированной иммунной клеткой по любому из пп. 46-50, конъюгатом антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтической композицией по любому из пп. 49-52 или набором по п. 55, *in vitro* или *in vivo*.

68. Способ по п. 66 или 67, где указанная клетка представляет собой раковую клетку.

69. Способ по п. 66 или 67, где указанная клетка представляет собой клетку солидной опухоли.

70. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-32, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 33-35, полинуклеотида по любому из пп. 36-38, вектора по п. 39, вируса по п. 42, модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 46-50, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтической композиции по любому из пп. 49-52 или набора по п. 55 в изготовлении лекарственного средства для лечения связанного с CLDN заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

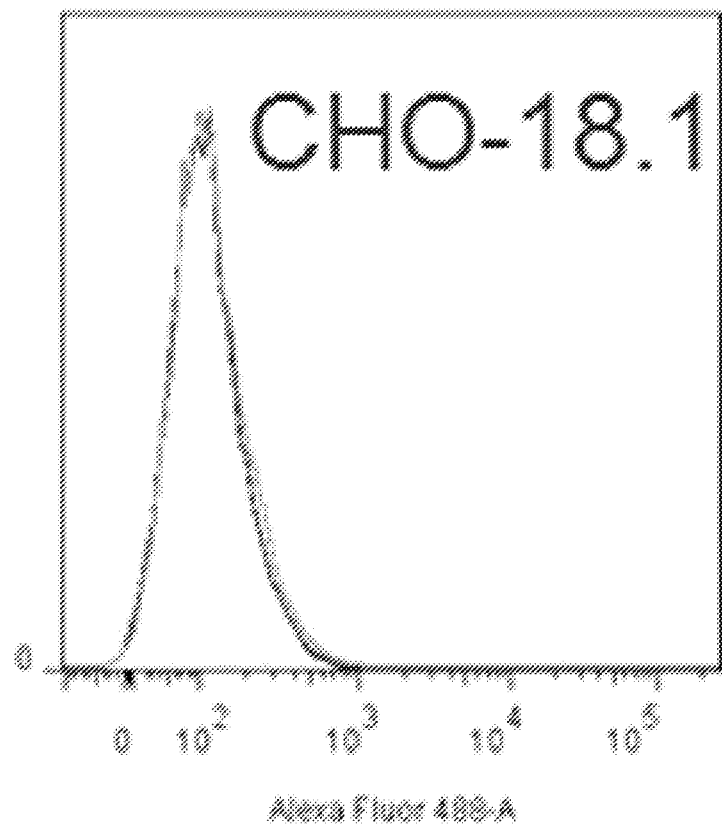
71. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-32, химерного антигенного рецептора по любому из пп. 33-35, полинуклеотида по любому из пп. 36-38, вектора по п. 39, вируса по п. 42, модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 46-50, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтической композиции по любому из пп. 49-52 или набора по п. 55 в изготовлении диагностического реагента для обнаружения связанного с CLDN состояния.

72. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35, полинуклеотид по любому из пп. 36-38, вектор по п. 39, вирус по п. 42, модифицированная иммунная клетка по любому

из пп. 46-50, конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтическая композиция по любому из пп. 49-52 или набор по п. 55 для применения в способе лечения связанного с CLDN состояния у нуждающегося в этом субъекта.

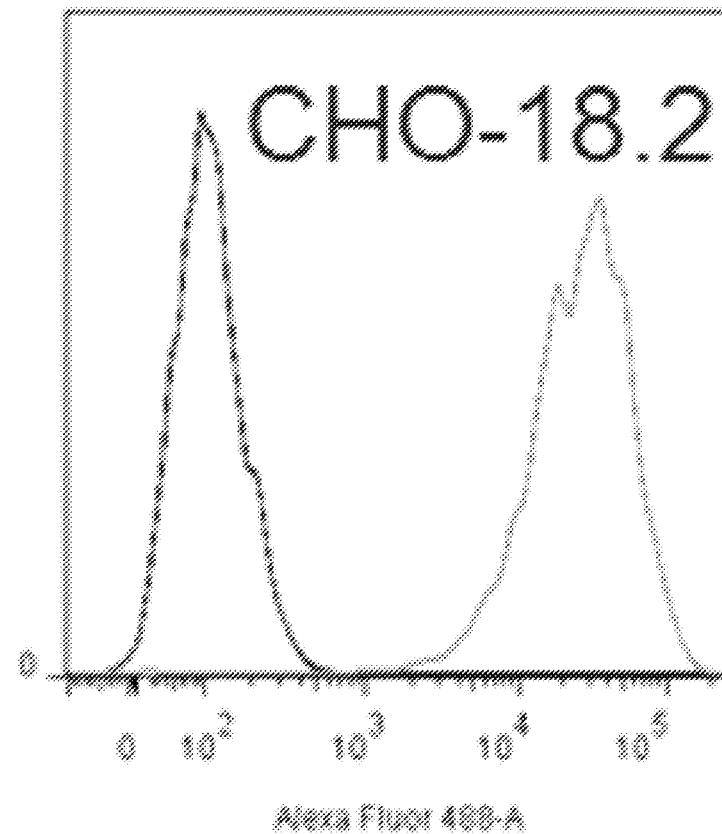
73. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-32, химерный антигенный рецептор по любому из пп. 33-35, полинуклеотид по любому из пп. 36-38, вектор по п. 39, вирус по п. 42, модифицированная иммунная клетка по любому из пп. 46-50, конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 44, фармацевтическая композиция по любому из пп. 49-52 или набор по п. 55 для применения в способе обнаружения связанного с CLDN состояния.

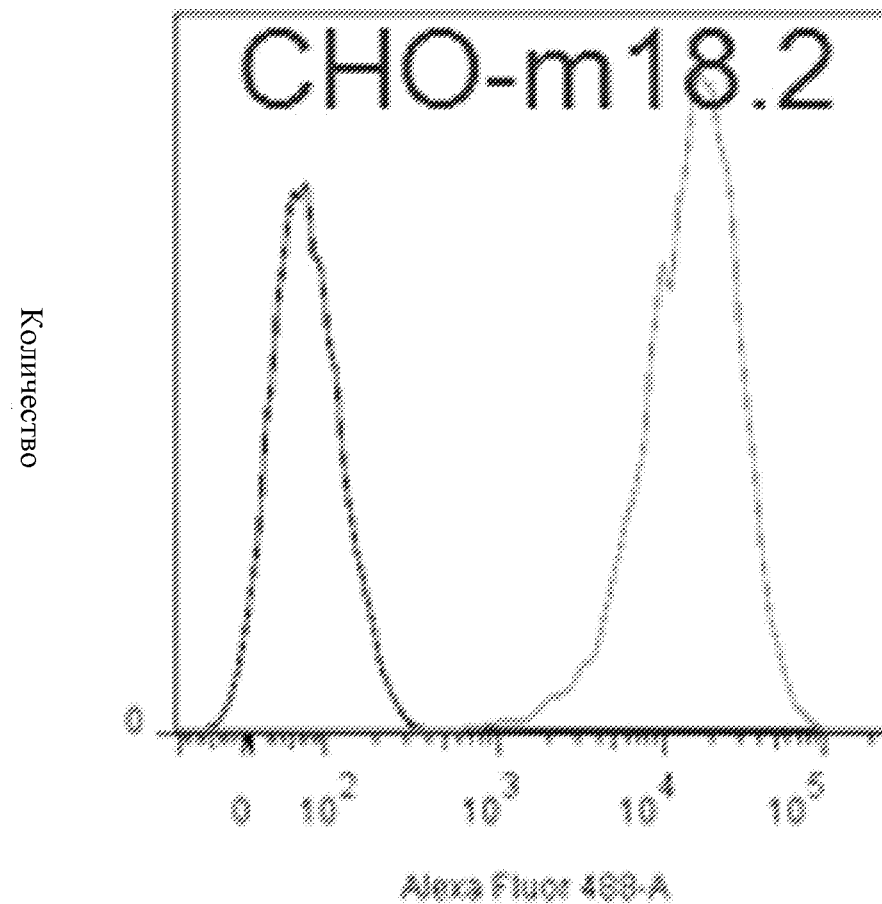
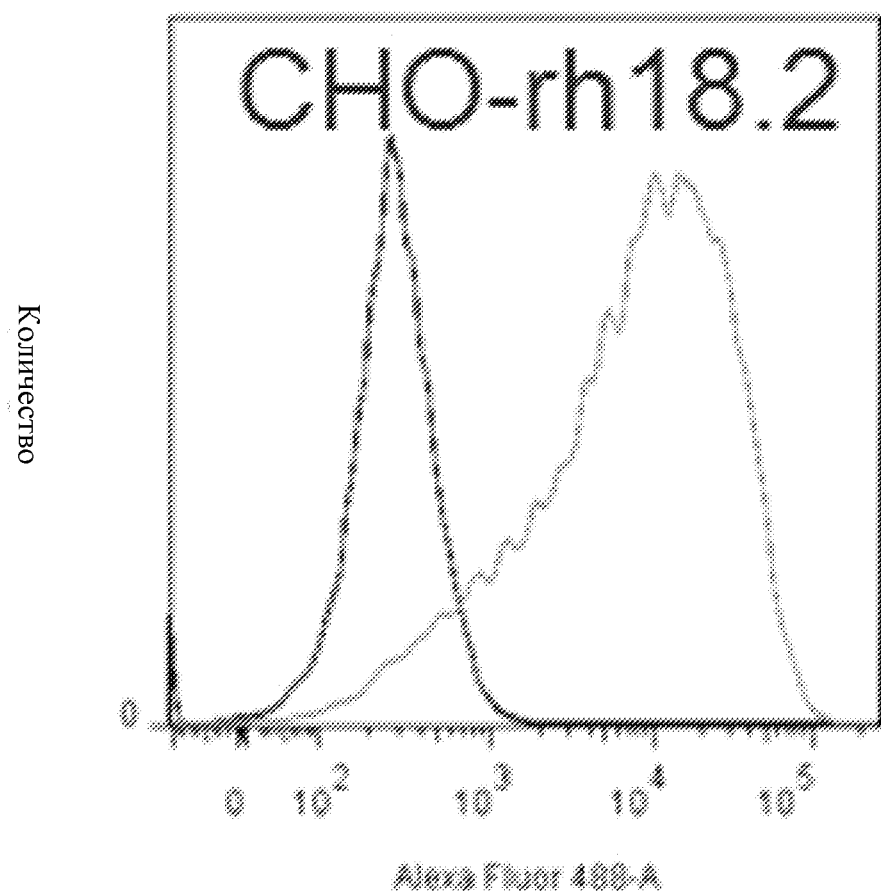
Количество



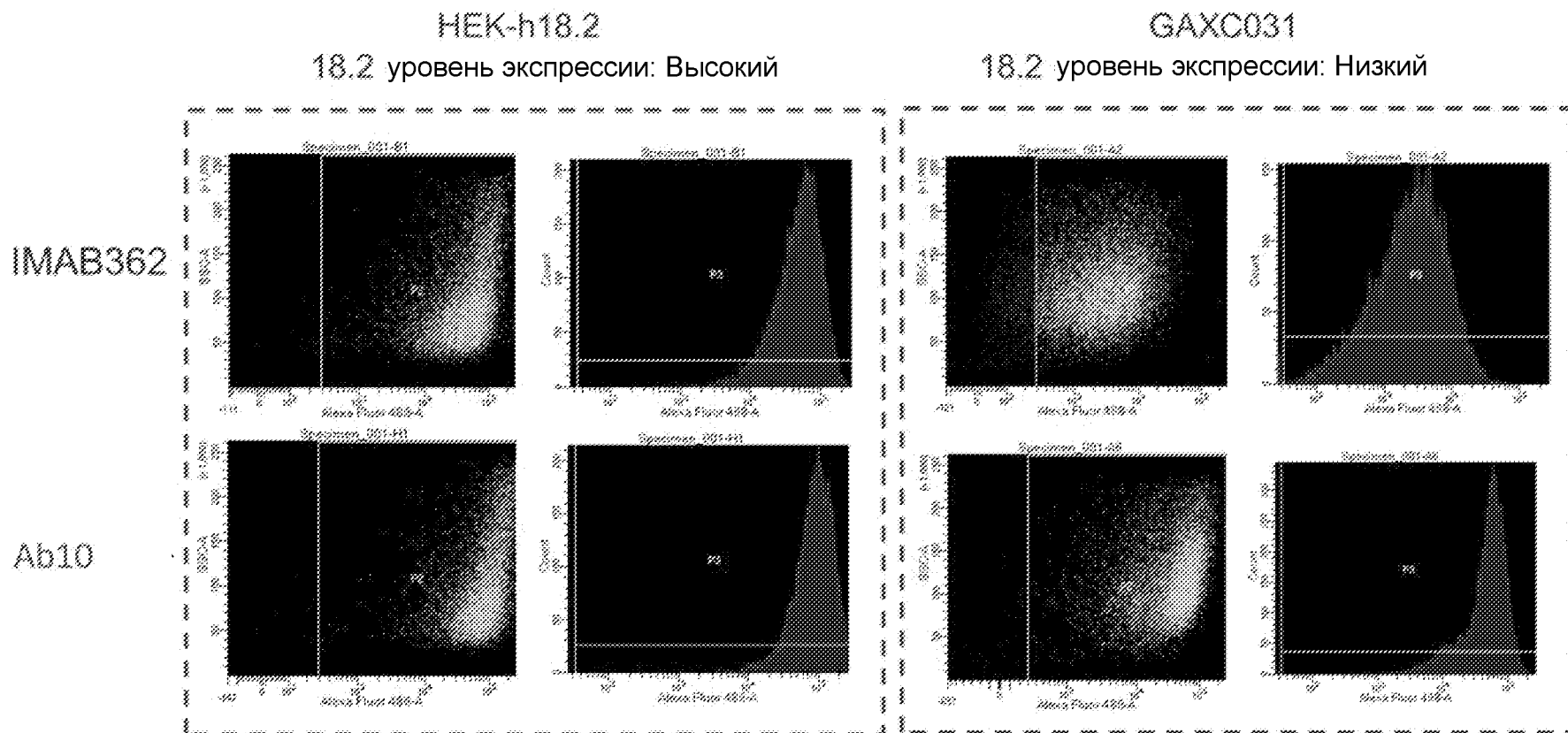
Фиг. 1А

Количество

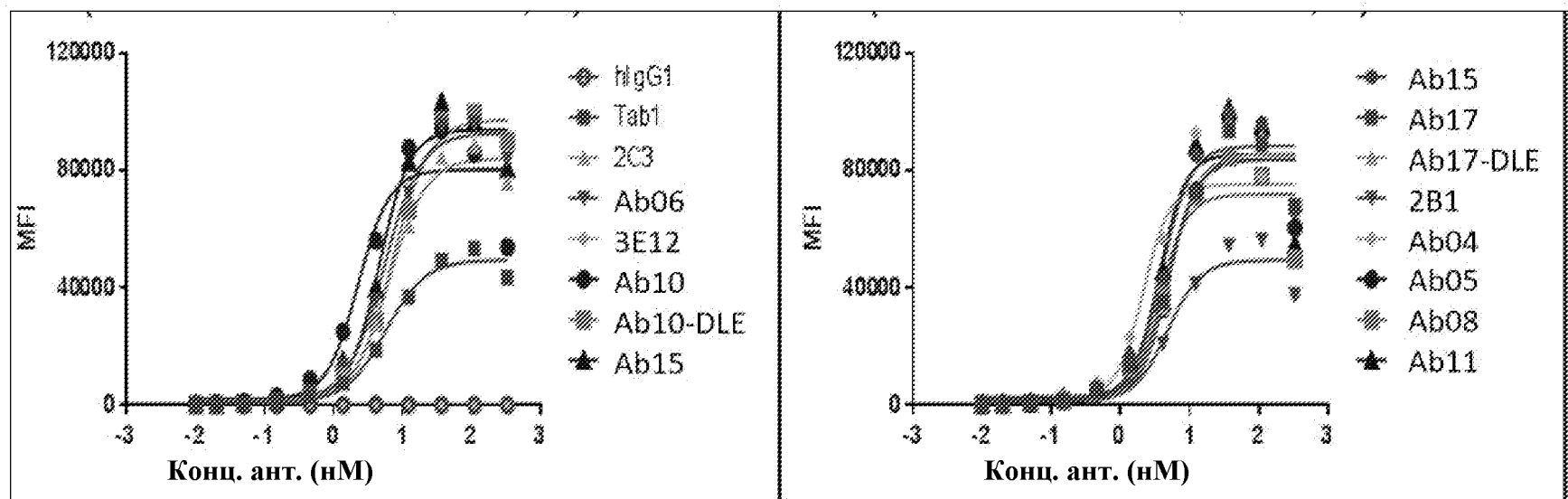




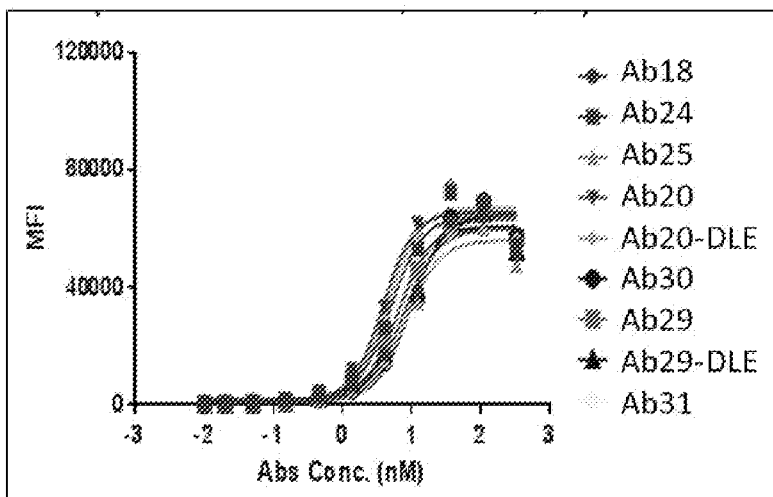
Фиг. 1В



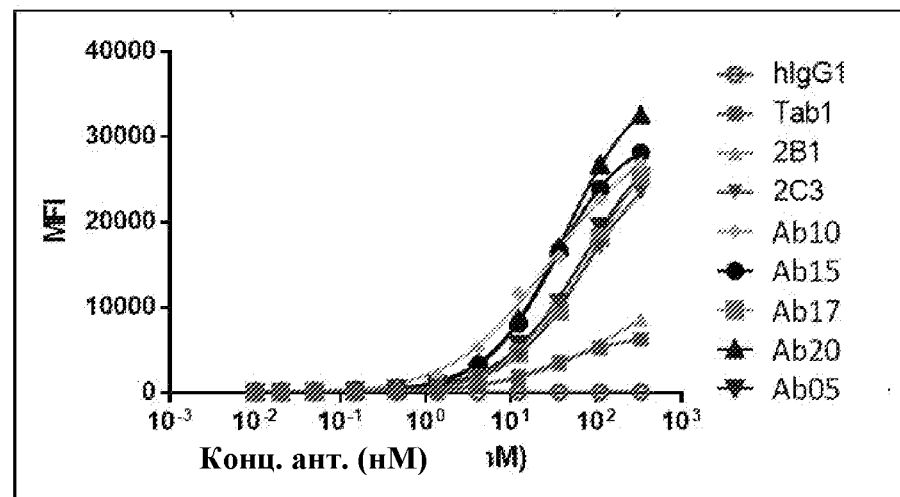
Фиг. 2



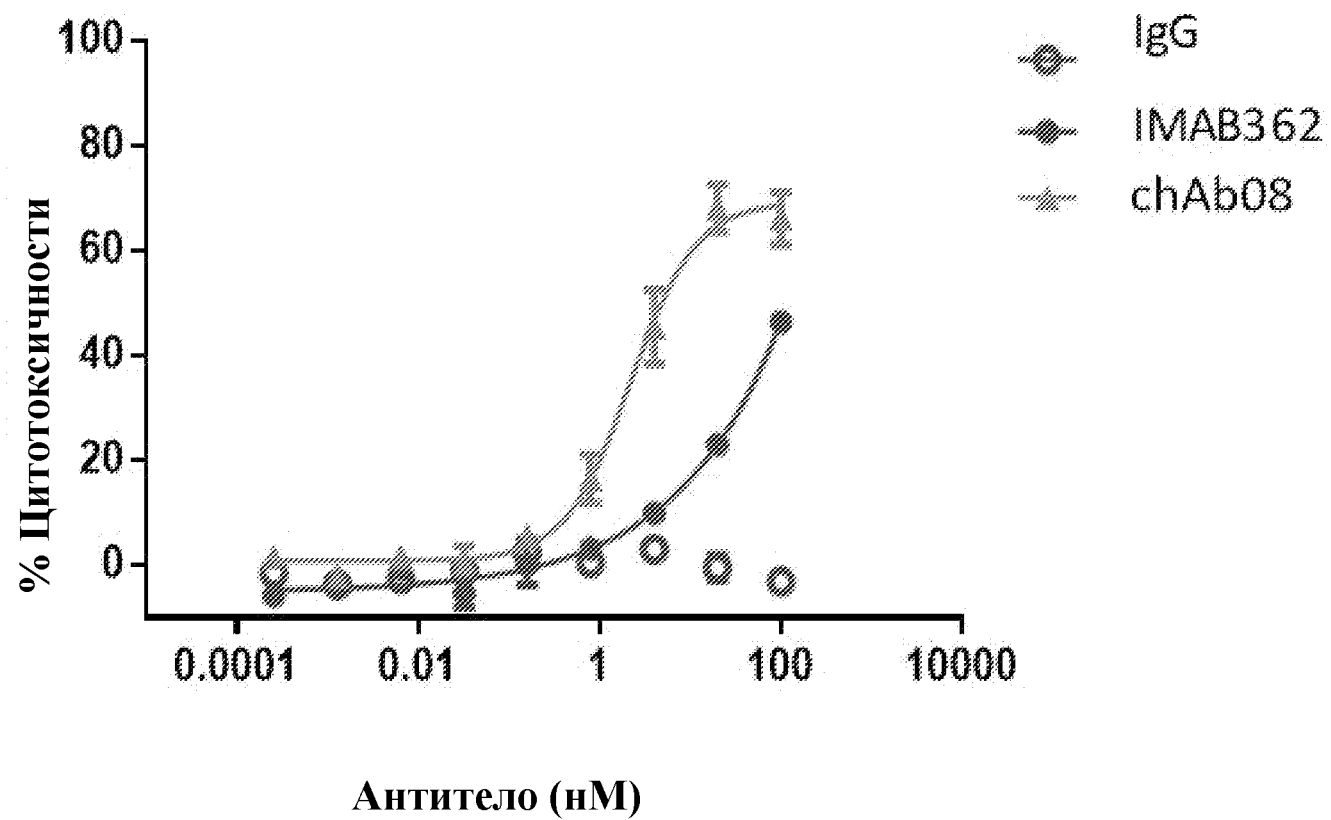
Фиг. 3А



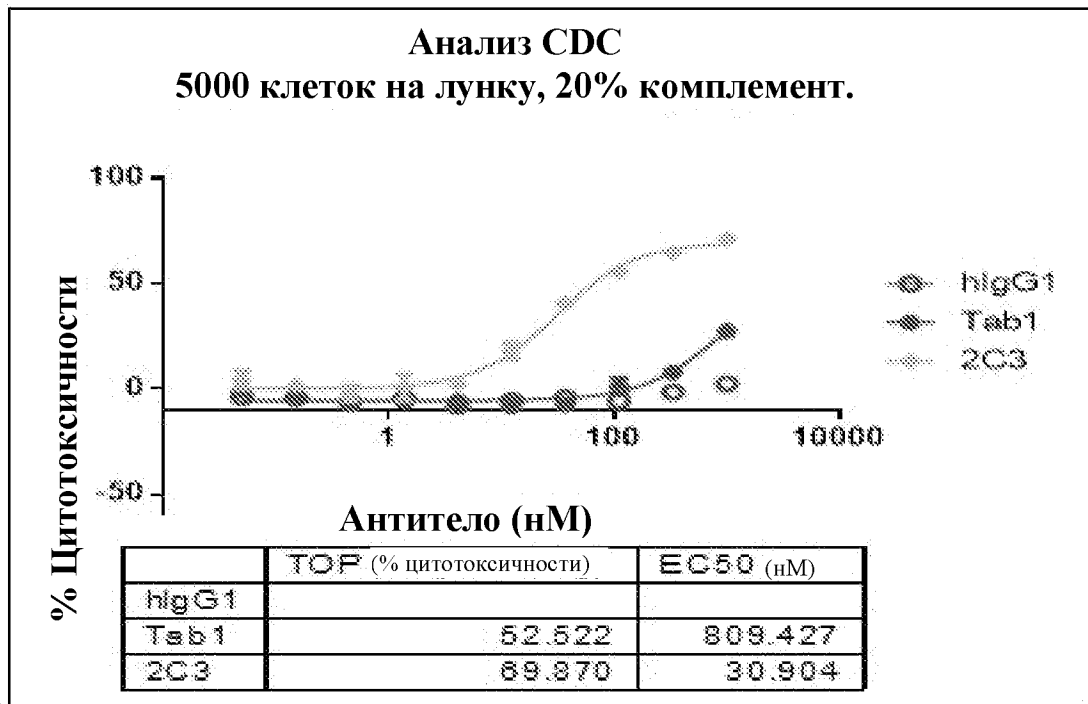
Конц. ант. (нМ)



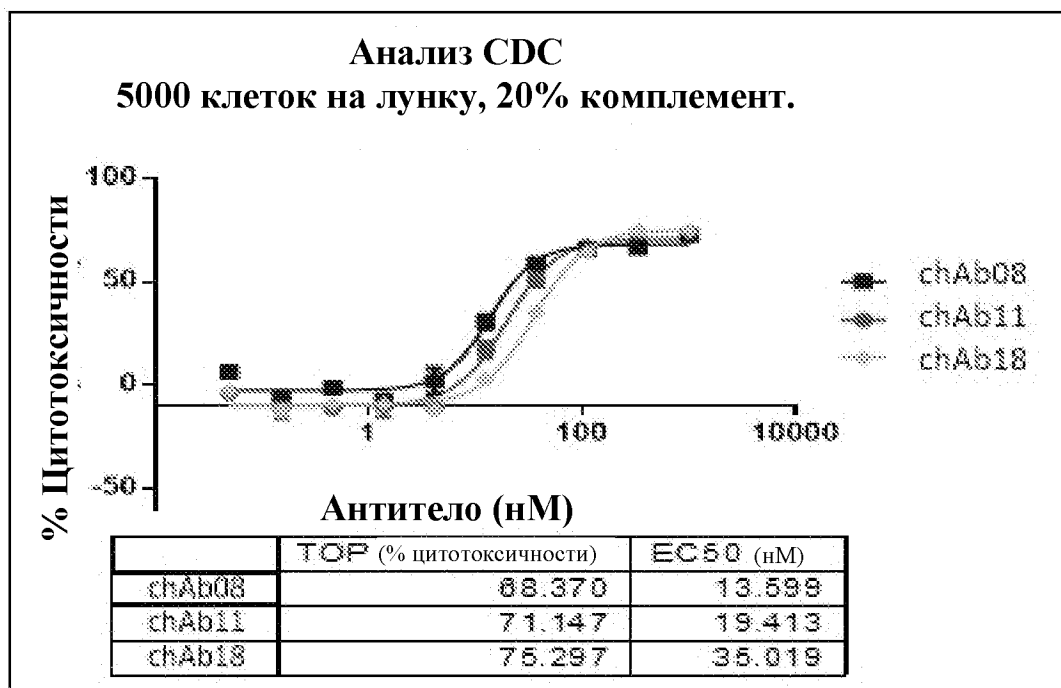
Фиг. 3В



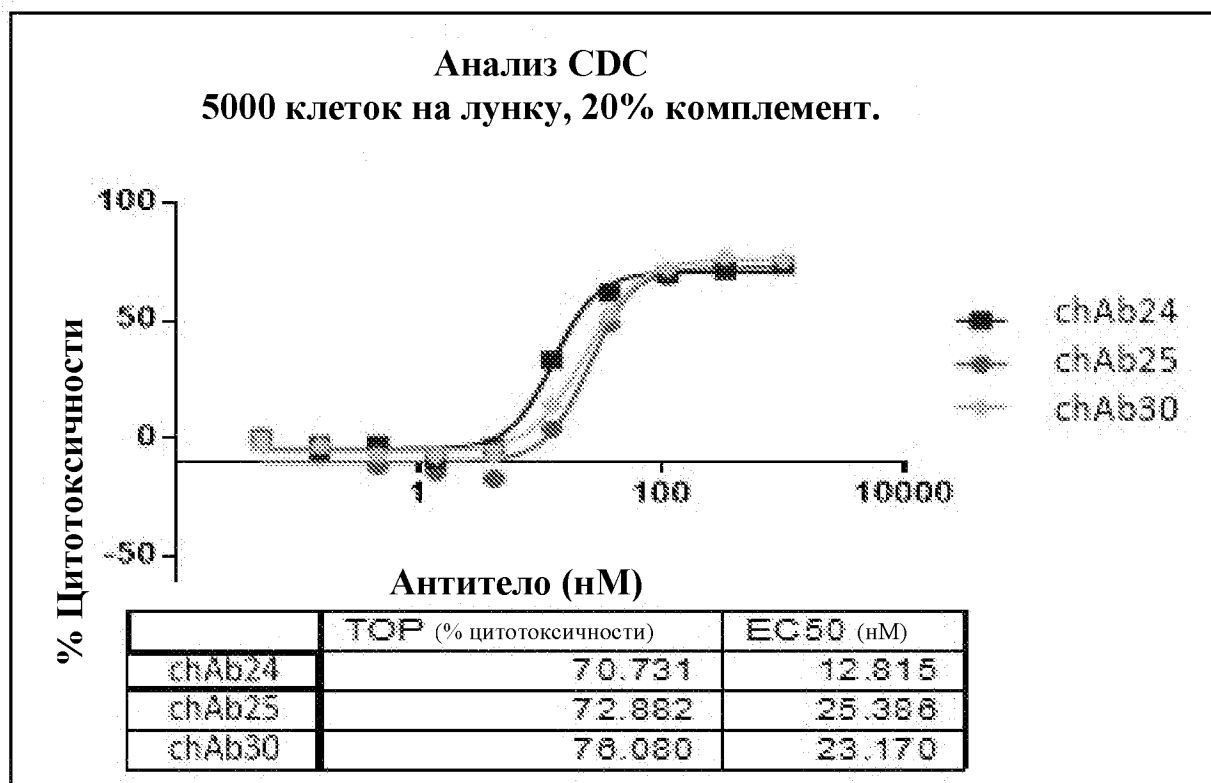
Фиг. 4



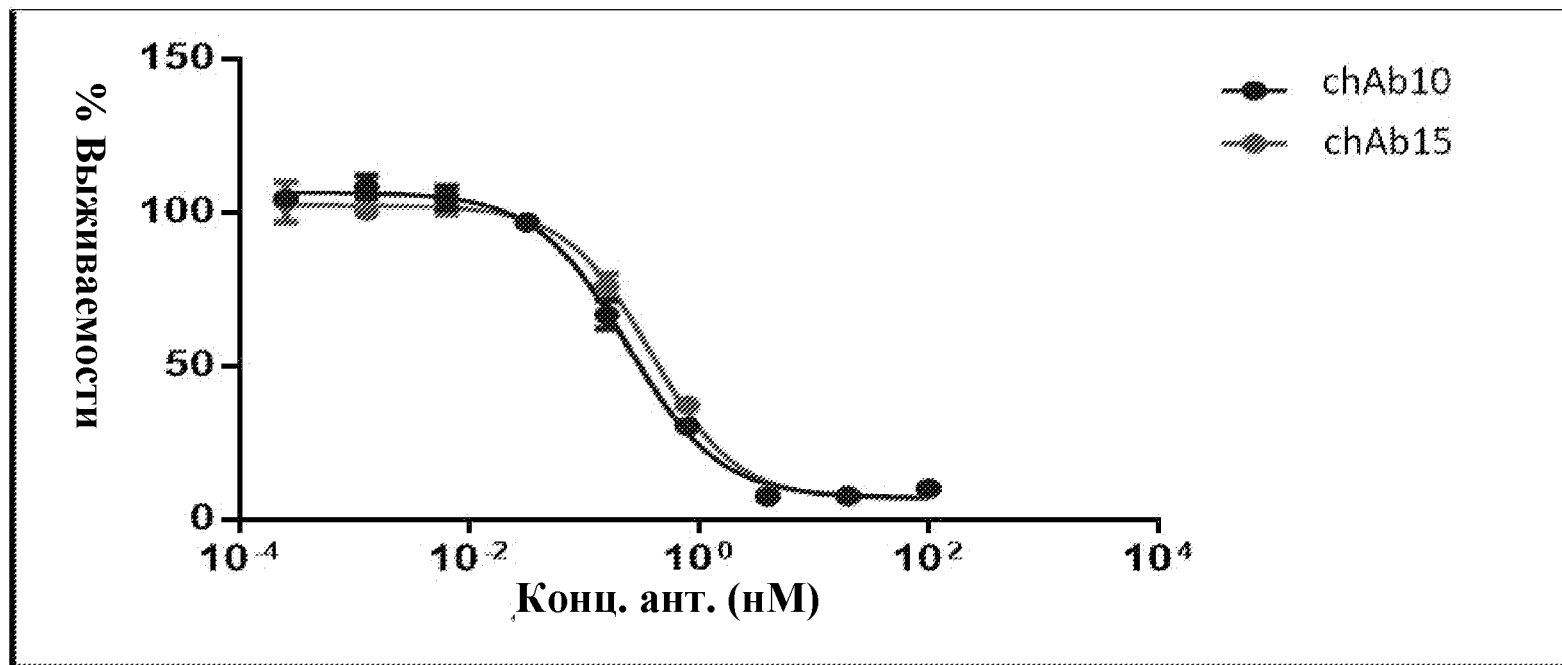
Фиг. 5А



Фиг. 5В

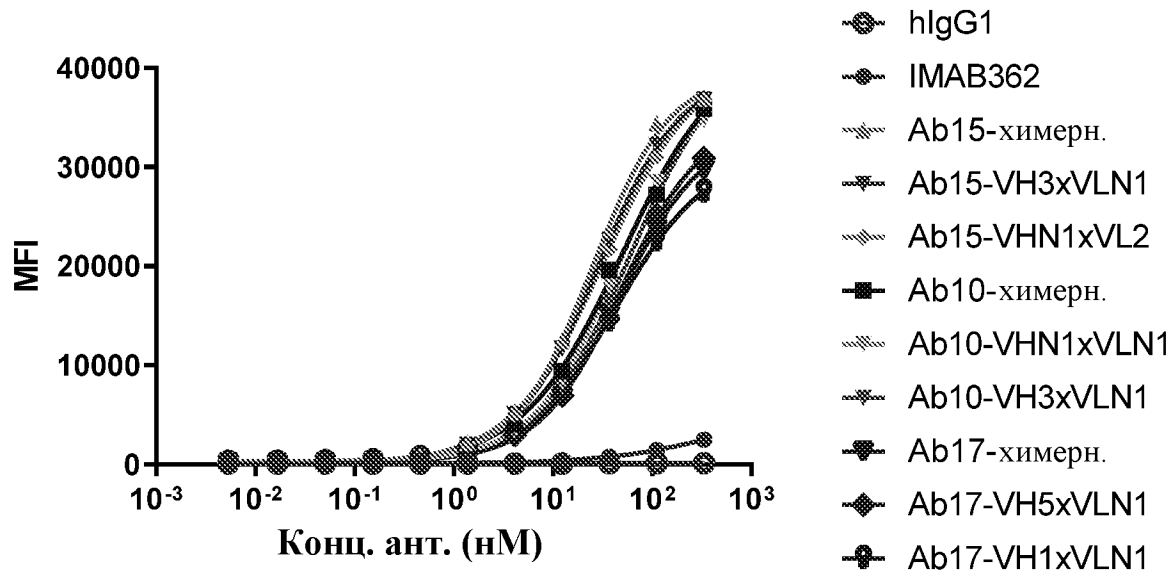


Фиг. 5С



Фиг. 6

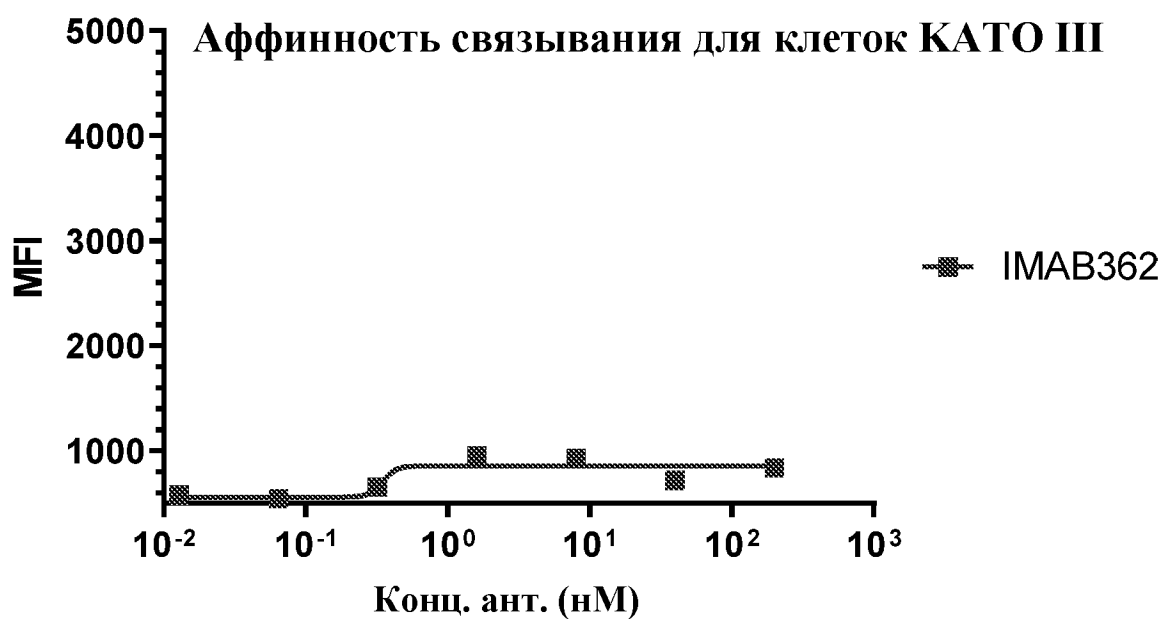
Определение аффинности для гуманизированных антител в клетках GAXC031



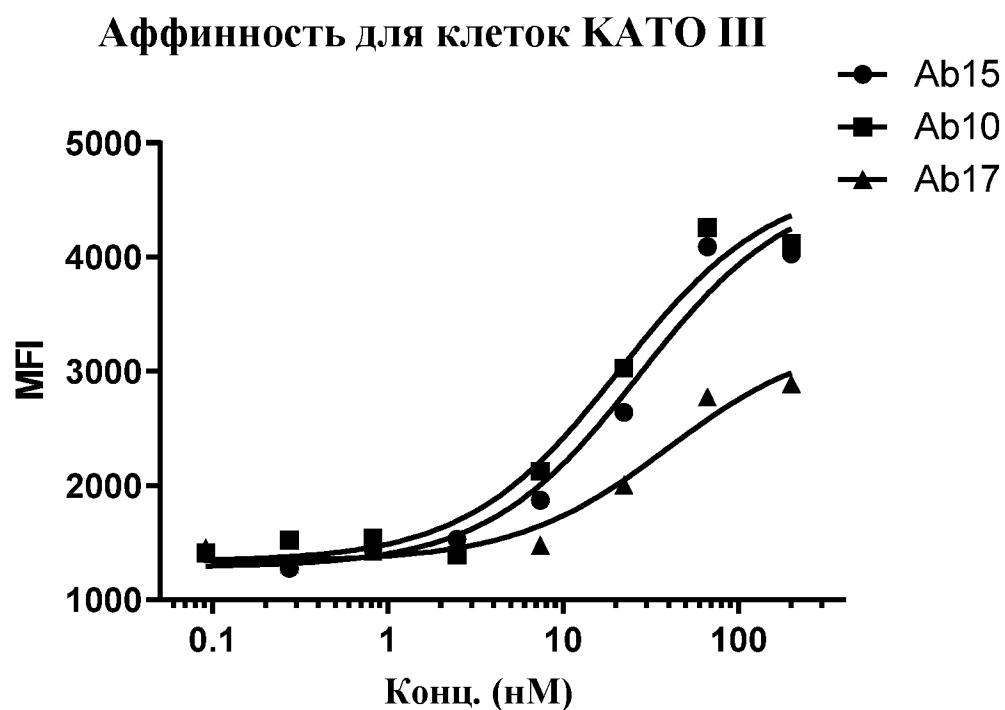
Фиг. 7А

№	антитело	Макс MFI	EC50(нМ)
1	hIgG1	—	—
2	IMAB362	2487.1	452.2
3	Ab15-химерн	36915.5	25.11
4	Ab15-VH3xVLN1	36812.3	28.63
5	Ab15-VHN1xVL2	36752.3	32.25
6	Ab10-химерн	35931.4	49.23
7	Ab10-VHN1xVLN1	34828.8	43.84
8	Ab10-VH3xVLN1	35183	60.89
9	Ab17-химерн	29885	47.02
10	Ab17-VH5xVLN1	30874.1	48.89
11	Ab17-VH1xVLN1	27492.7	43.68

Фиг. 7В



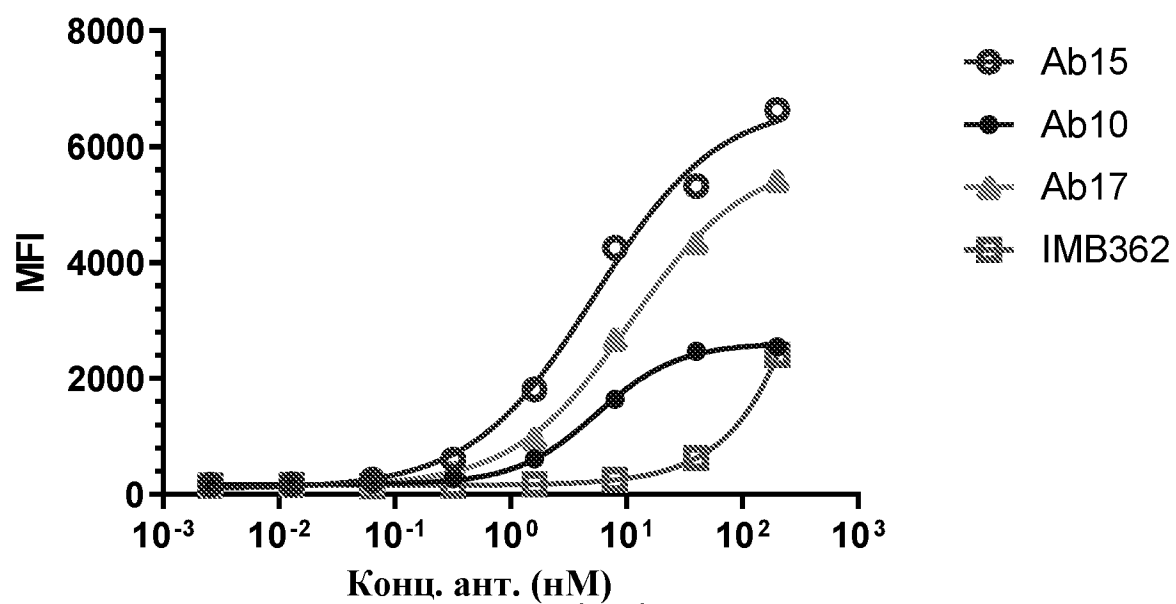
Фиг. 8А



	Ab15	Ab10	Ab17
EC50	27.19	20.89	39.31

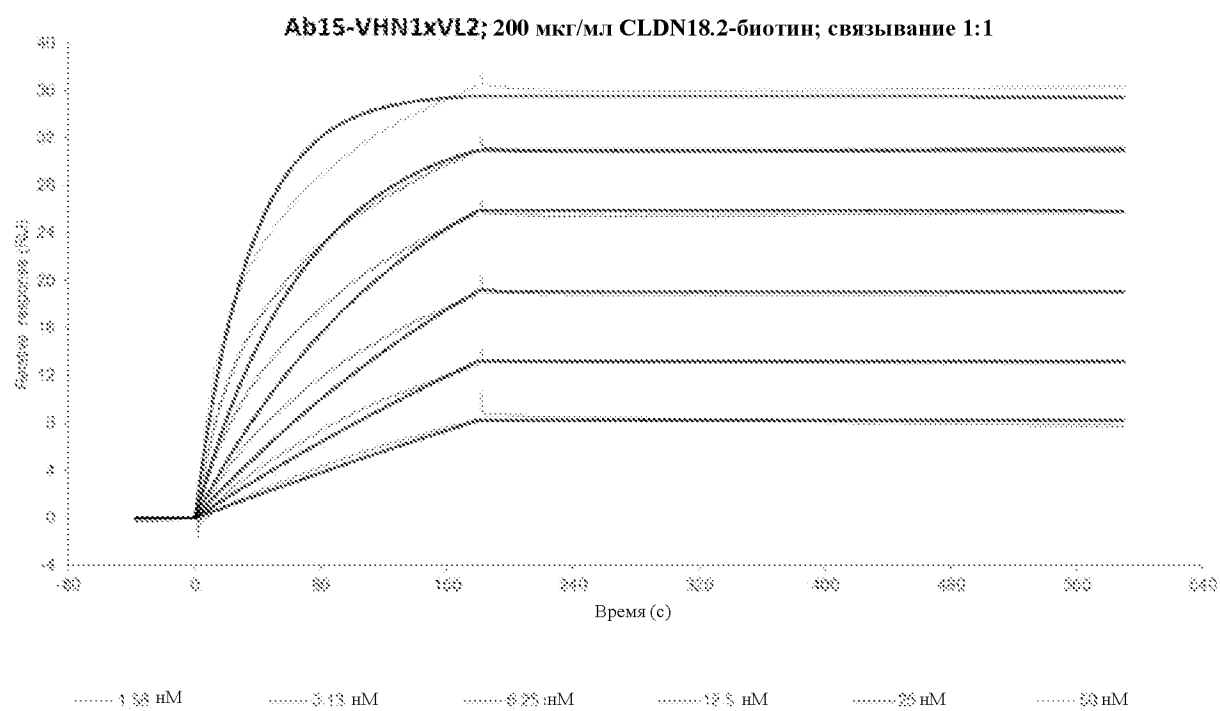
Фиг. 8В

Аффинность связывания для клеток SNU620

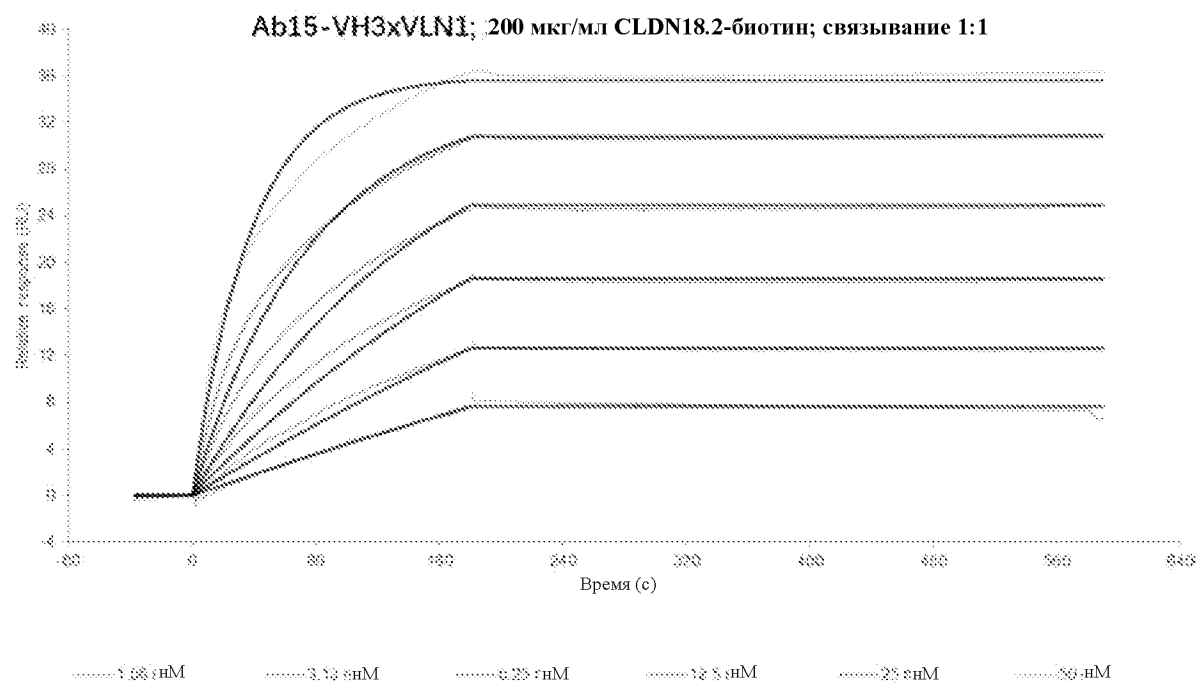


	Ab15	Ab10	Ab17	IMB362
EC50	5.317	5.538	10.79	~ 7537

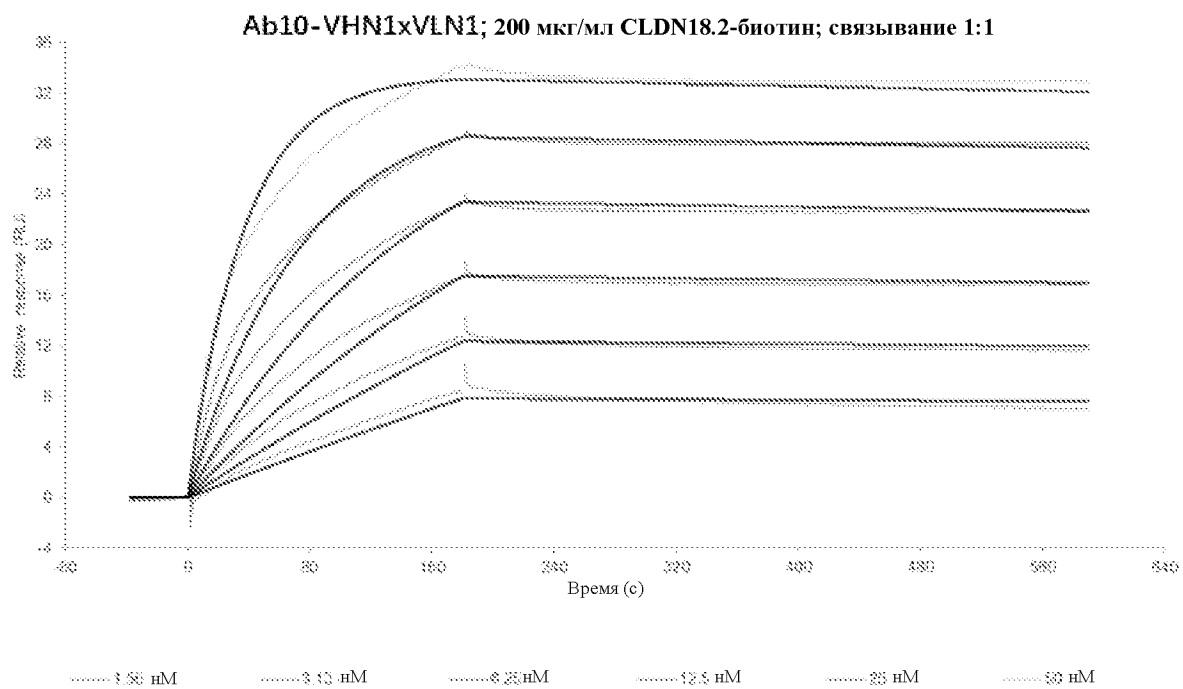
Фиг. 8С



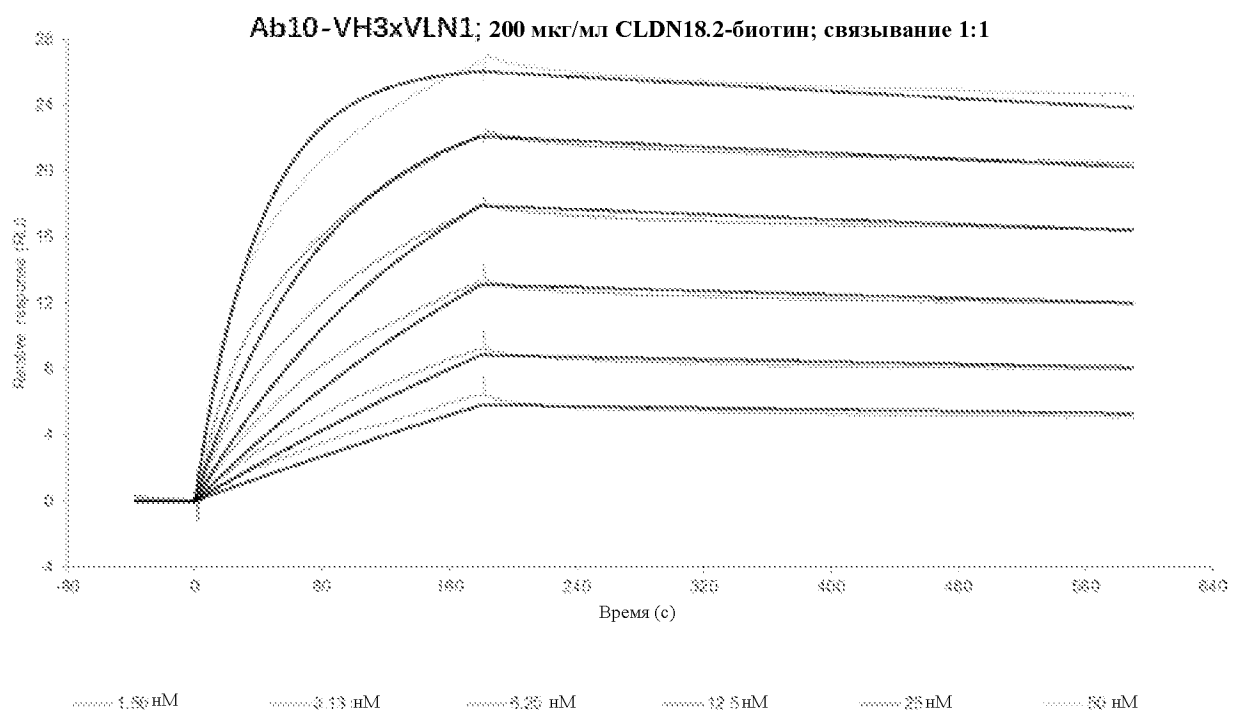
Фиг. 9А



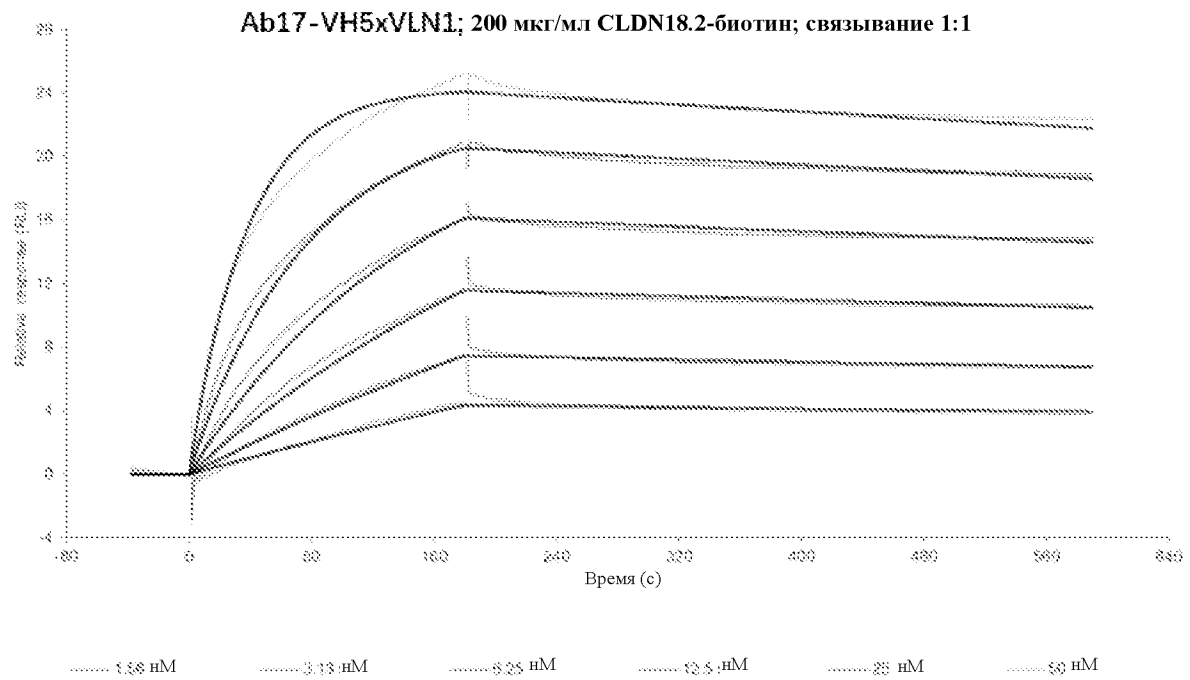
Фиг. 9В



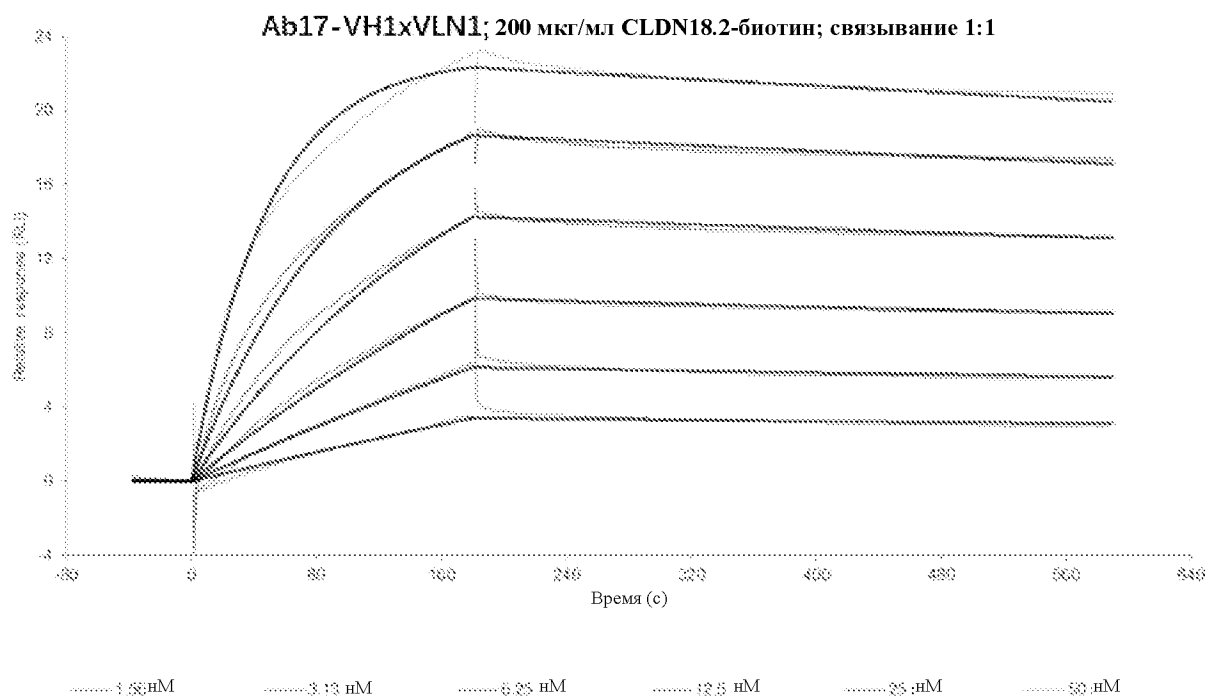
Фиг. 9С



Фиг. 9D



Фиг. 9Е

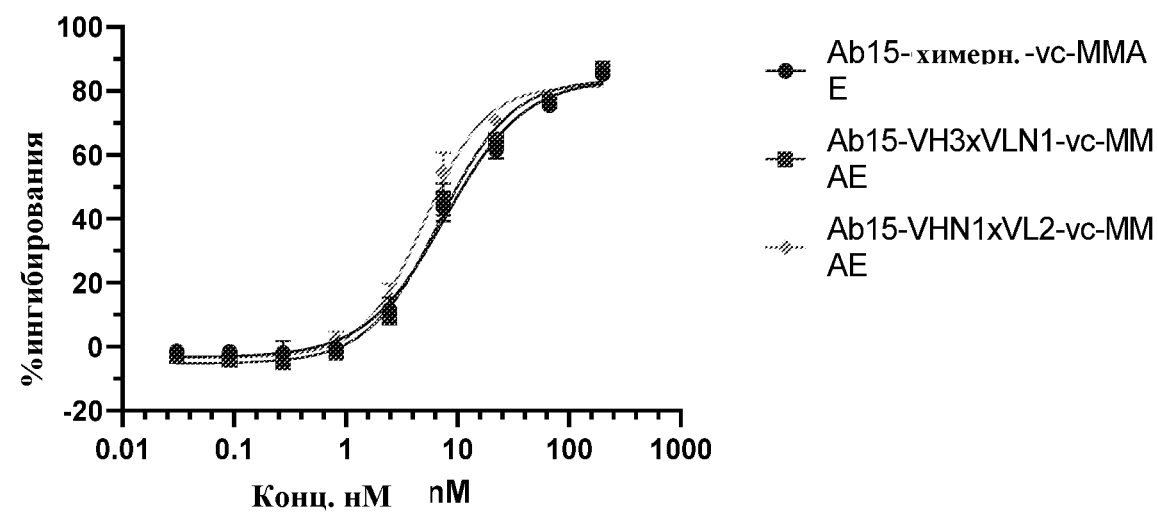


Фиг. 9F

№	Кинетич. модель	Иммоб. лиганд	Раствор анализата 1	Кинетика Chi ² (RU ²)	k _a (1/Mc)	k _d (1/c)	KD (M)
1	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab15-VH3xVLN1	5.03E-01	5.26E+05	3.72E-07	7.07E-13
2	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab15-VHN1xVL2	6.19E-01	5.69E+05	5.35E-06	9.40E-12
3	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab10-VHN1xVLN1	6.03E-01	5.47E+05	7.57E-05	1.39E-10
4	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab10-VH3xVLN1	3.48E-01	4.89E+05	2.16E-04	4.41E-10
5	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab17-VH5xVLN1	1.47E-01	5.26E+05	2.42E-04	4.60E-10
6	связывание 1:1	200 мкг/мл CLDN18.2-биотин	Ab17-VH1xVLN1	1.03E-01	4.23E+05	2.09E-04	4.95E-10

Фиг. 9G

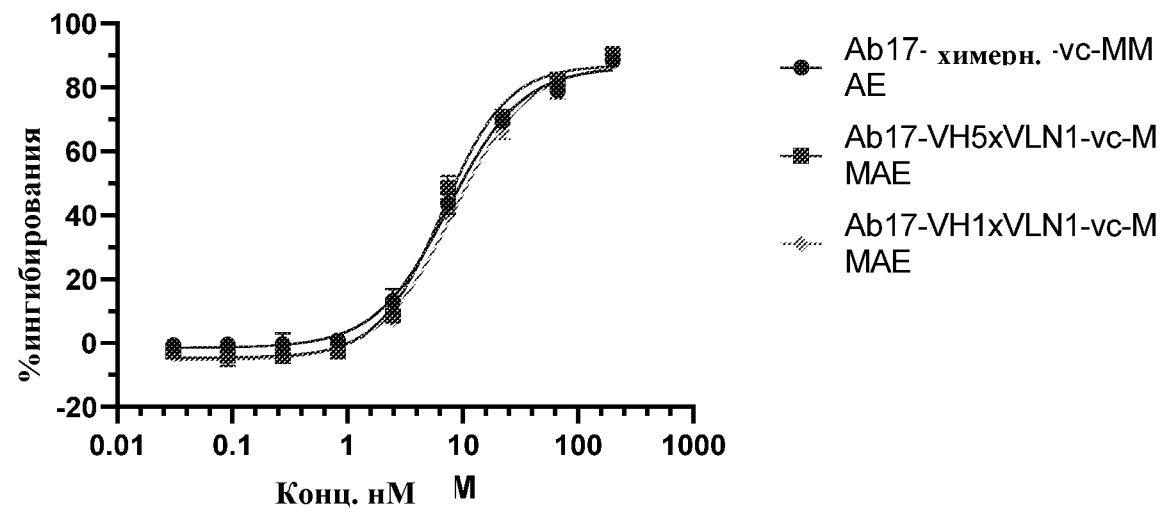
Анализ цитотоксичности ADC для клеток CHOK1-CDLN18/2



	Ab15-(химерн.-vc-MMAE	Ab15-VH3xVLN1-vc-MMAE	Ab15-VHN1xVL2-vc-MMAE
IC50	7.750	6.930	5.065

Фиг. 10А

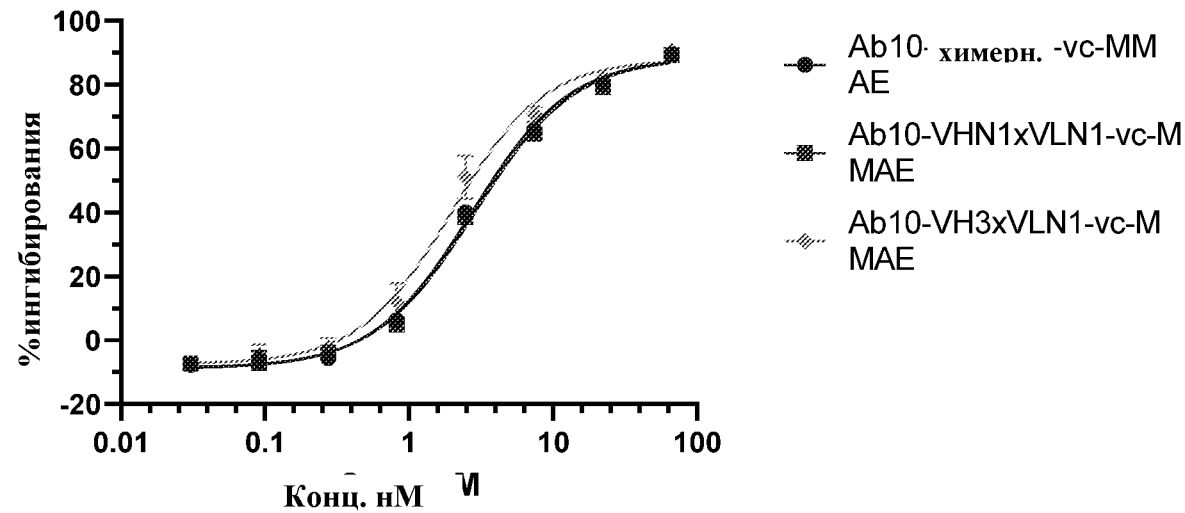
Анализ цитотоксичности ADC для клеток CHOK1-CDLN18/2



	Ab17- химерн. -vc-MMAE	Ab17-VH5xVLN1-vc-MMAE	Ab17-VH1xVLN1-vc-MMAE
IC50	7.535	6.686	8.258

Фиг. 10В

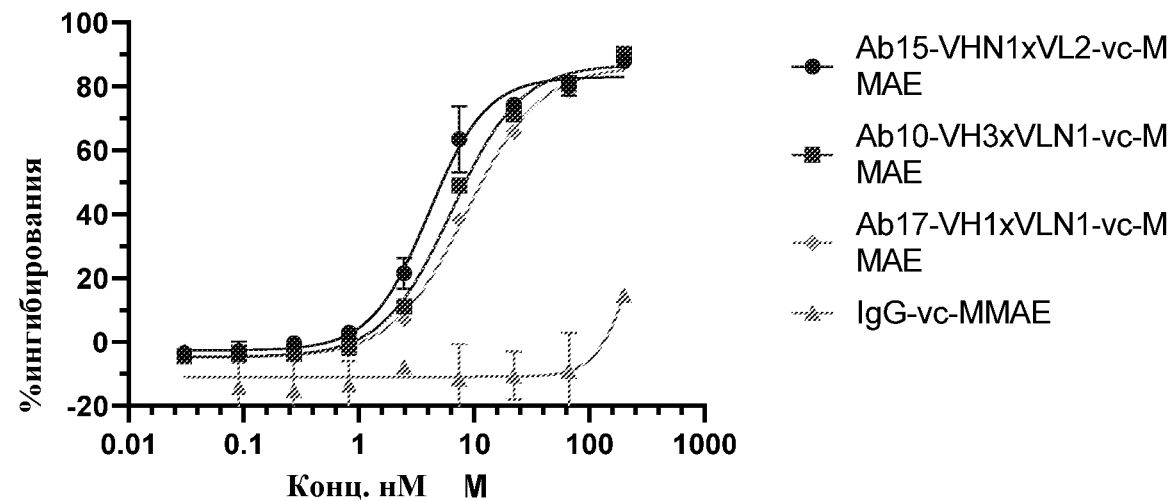
Анализ цитотоксичности ADC для клеток CHOK1-CDLN18/2



	Ab10-химерн.-vc-MMAE	Ab10-VHN1xVLN1-vc-MMAE	Ab10-VH3xVLN1-vc-MMAE
IC50	2.711	2.865	1.988

Фиг. 10С

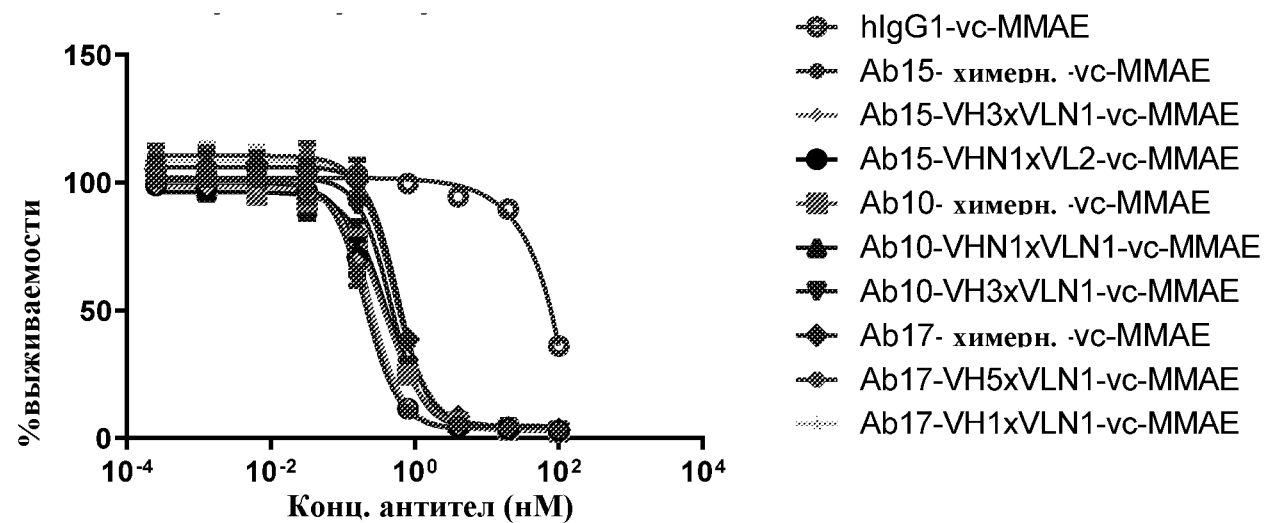
Анализ цитотоксичности ADC для клеток CHOK1-CDLN18/2



	Ab15-VHN1xVL2-vc-MMAE	Ab10-VH3xVLN1-vc-MMAE	Ab17-VH1xVLN1-vc-MMAE	IgG-vc-MMAE
IC50	4.033	6.418	8.614	266.8

Фиг. 10D

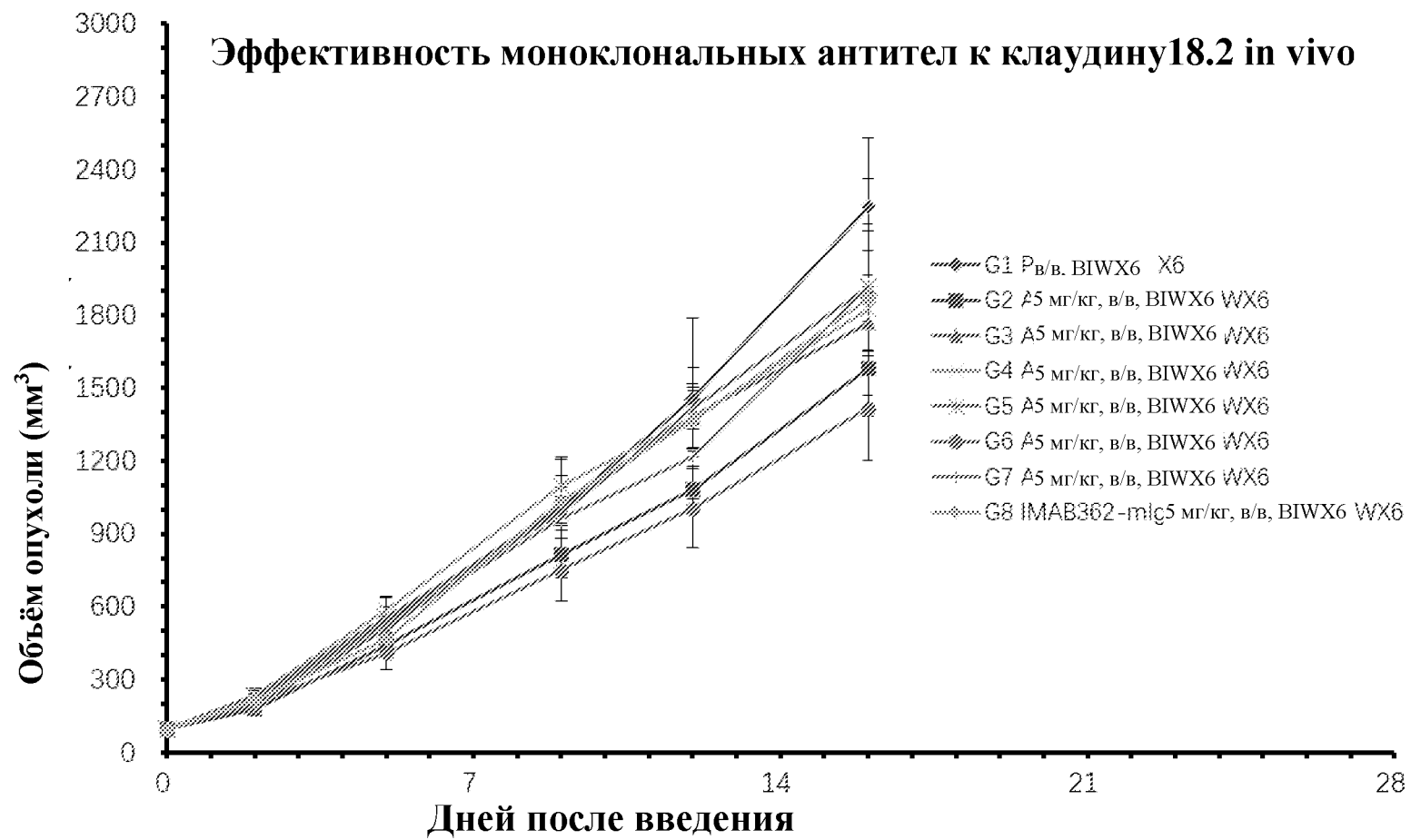
Анализ цитотоксичности ADC для клеток GAXC031



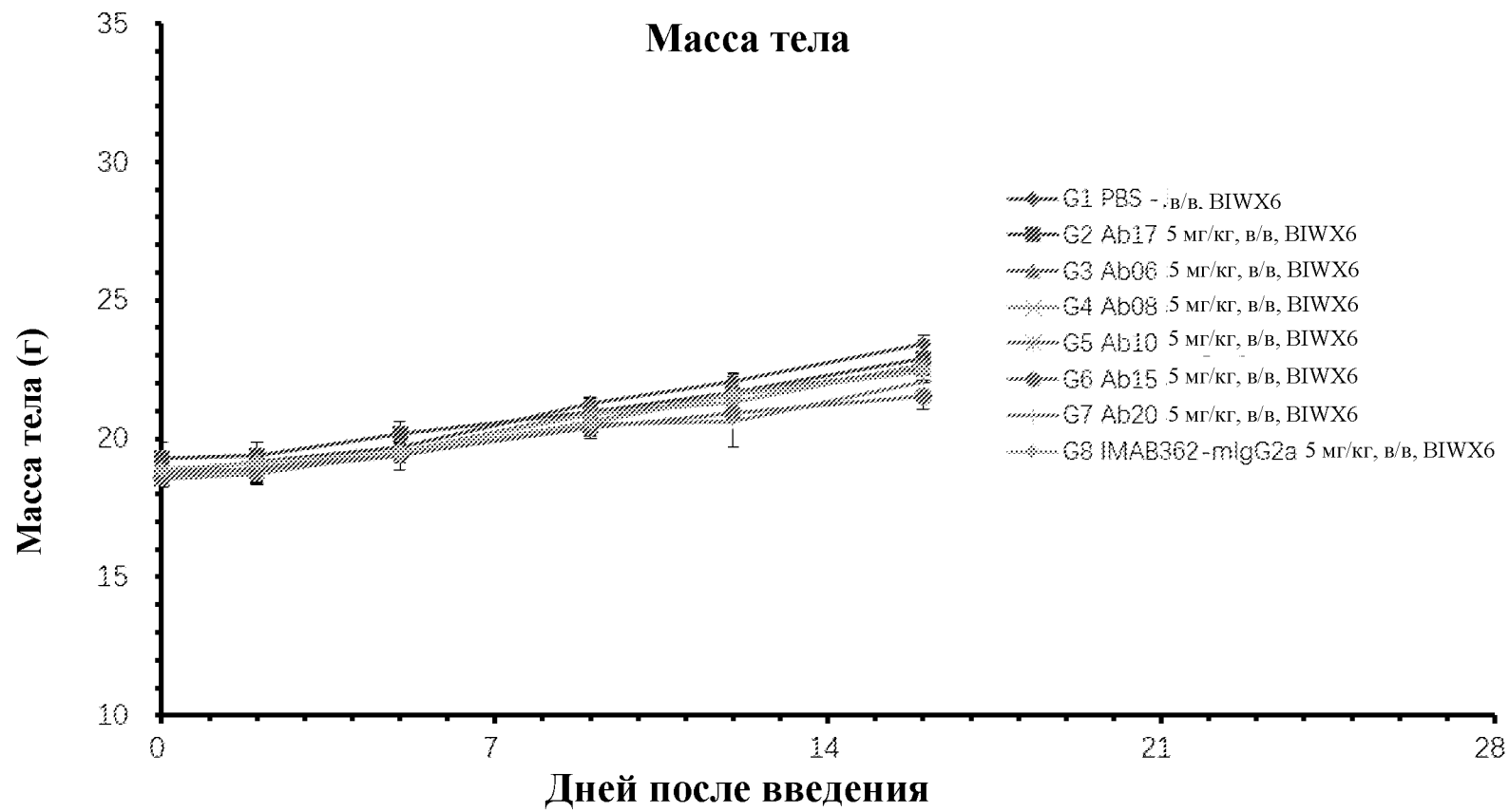
Фиг. 10Е

	GAXC031,2000 на лунку, 120 ч	
ID образца	Макс. % ингиб.	IC50 (нМ)
hIgG1-vc-MMAE	63.94	-
Ab15-химерн. -vc-MMAE	96.89	0.20
Ab15-VH3xVLN1-vc-MMAE	97.28	0.25
Ab15-VHN1xVL2-vc-MMAE	97.11	0.25
Ab10-химерн. -vc-MMAE	97.49	0.36
Ab10-VHN1xVLN1-vc-MMAE	97.28	0.41
Ab10-VH3xVLN1-vc-MMAE	97.05	0.46
Ab17-химерн. -vc-MMAE	96.69	0.58
Ab17-VH5xVLN1-vc-MMAE	96.39	0.51
Ab17-VH1xVLN1-vc-MMAE	96.47	0.53

Фиг. 10F

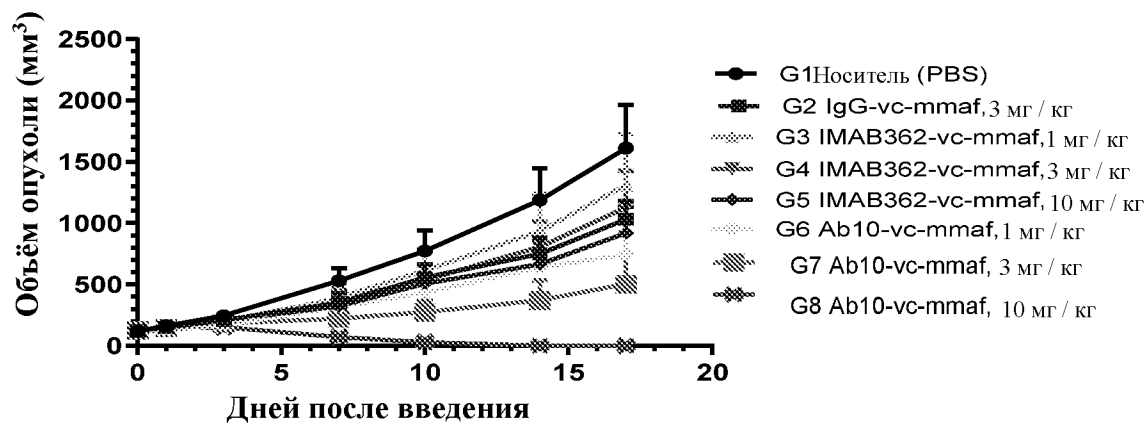


Фиг. 11А

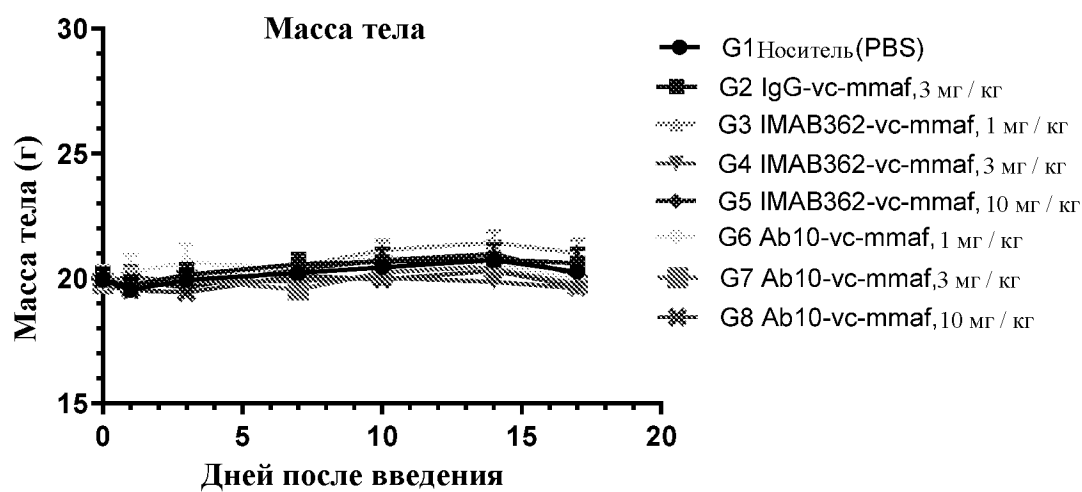


Фиг. 11В

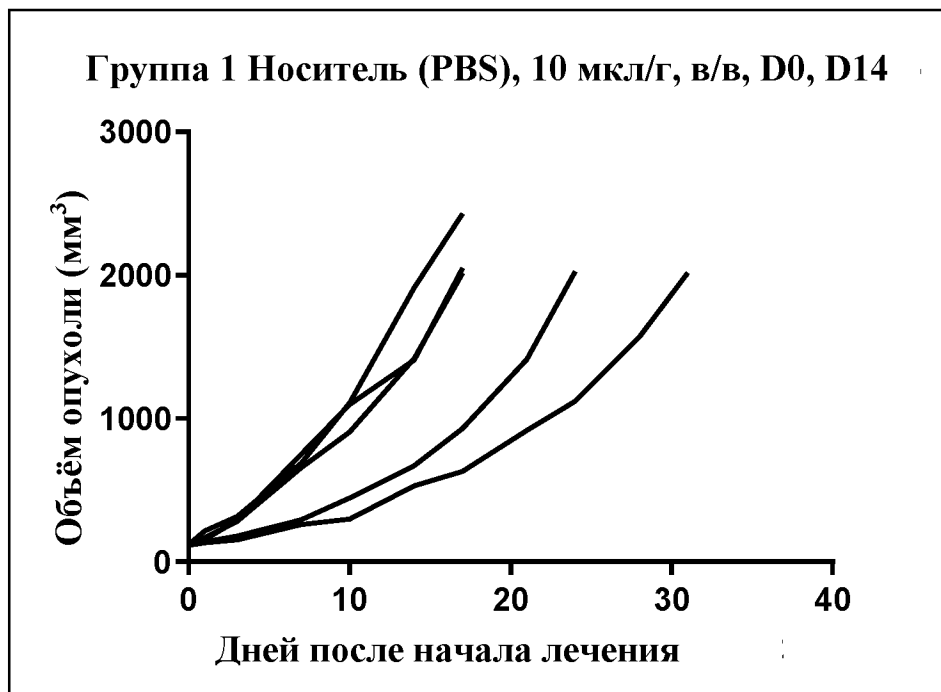
Анализ эффективности ADC *in vivo* для клеток GACC031



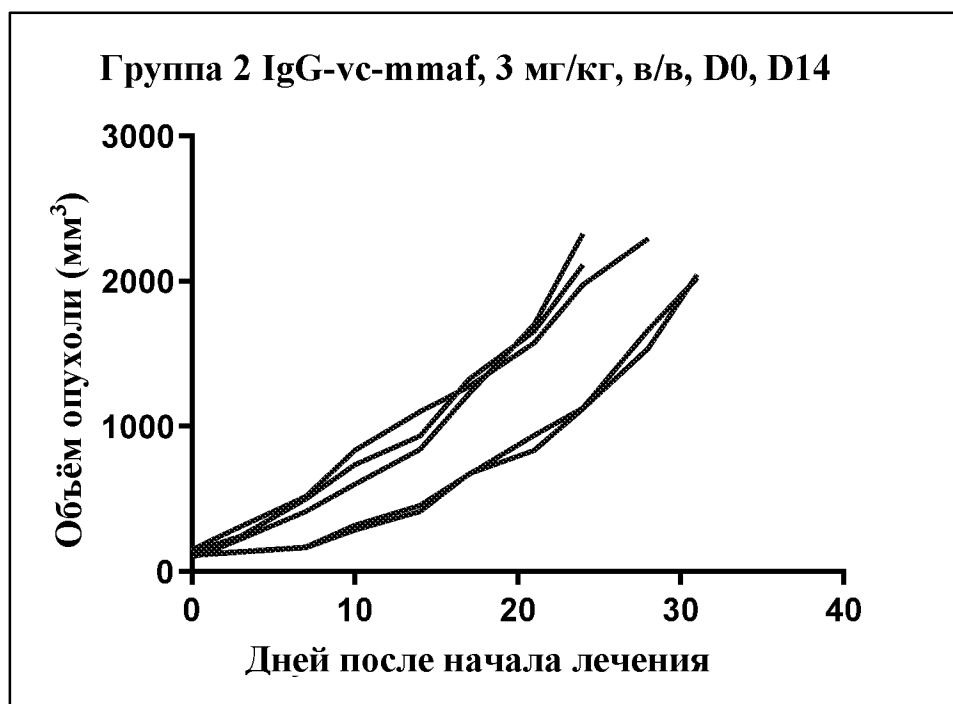
Фиг. 12А



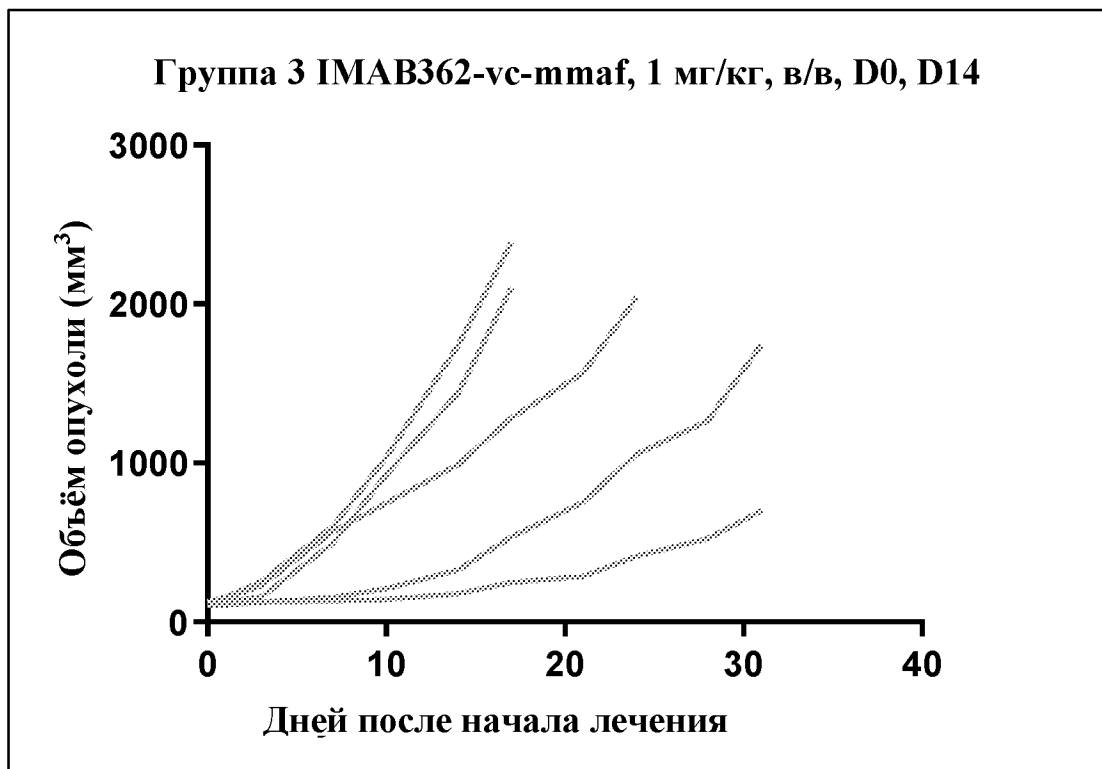
Фиг. 12В



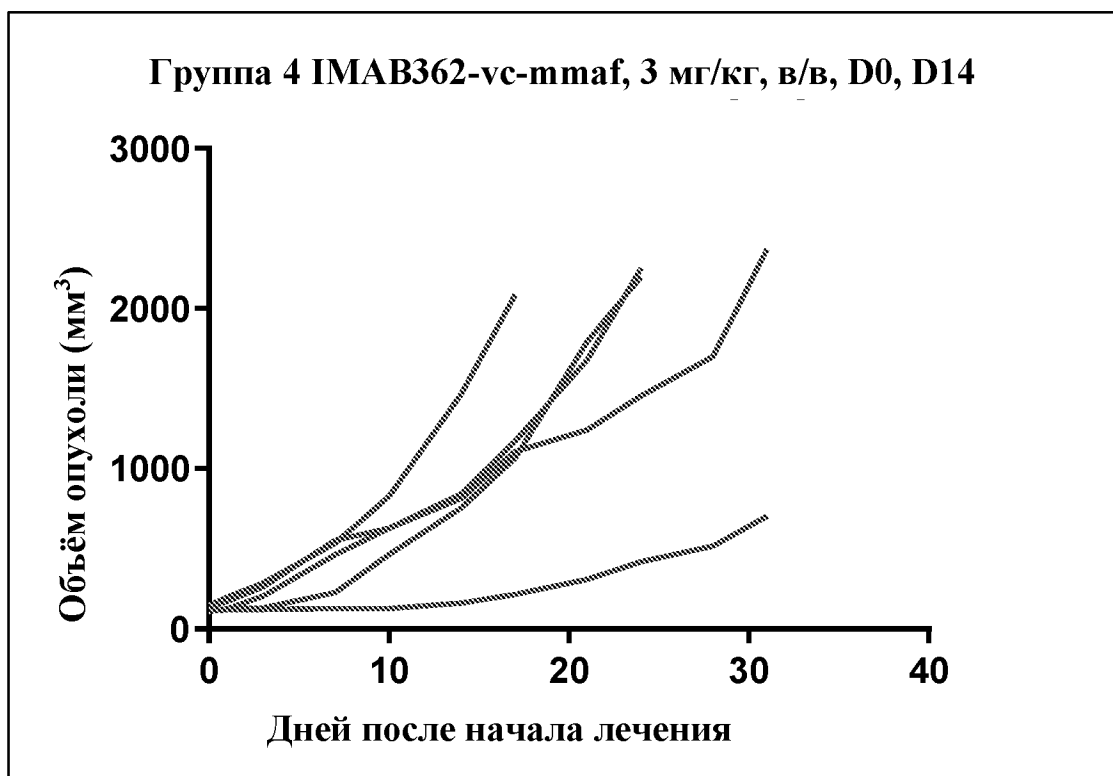
Фиг. 12С



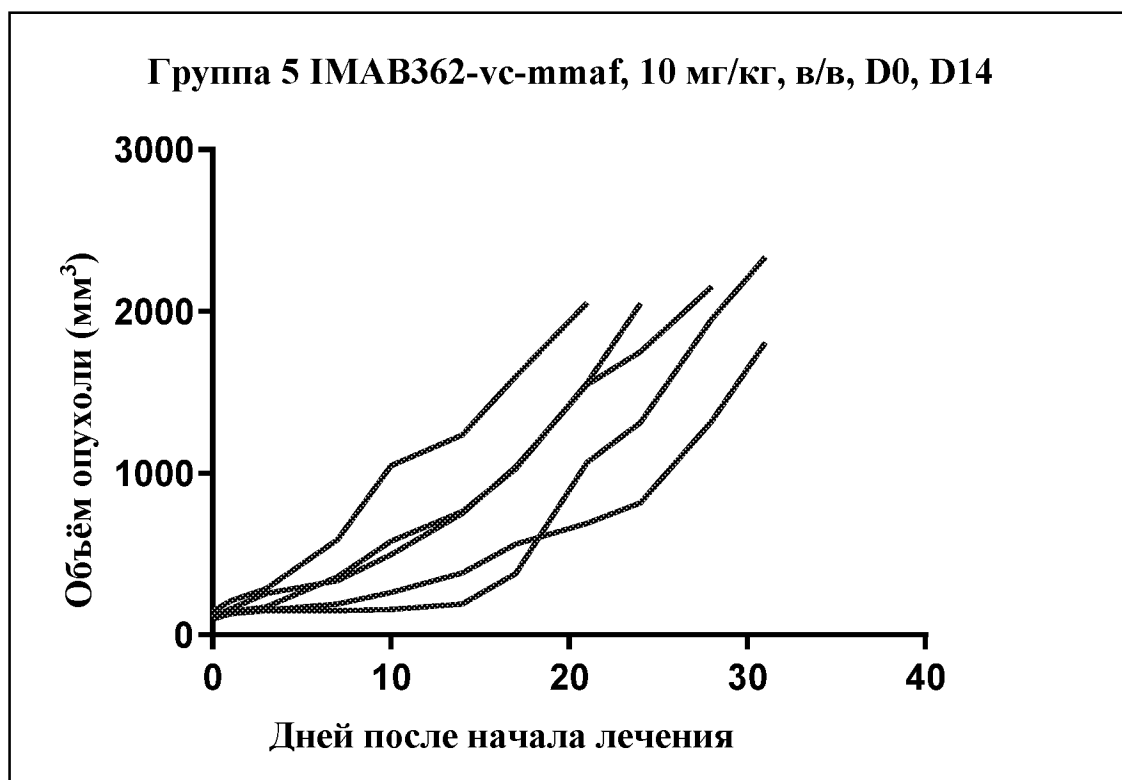
Фиг. 12D



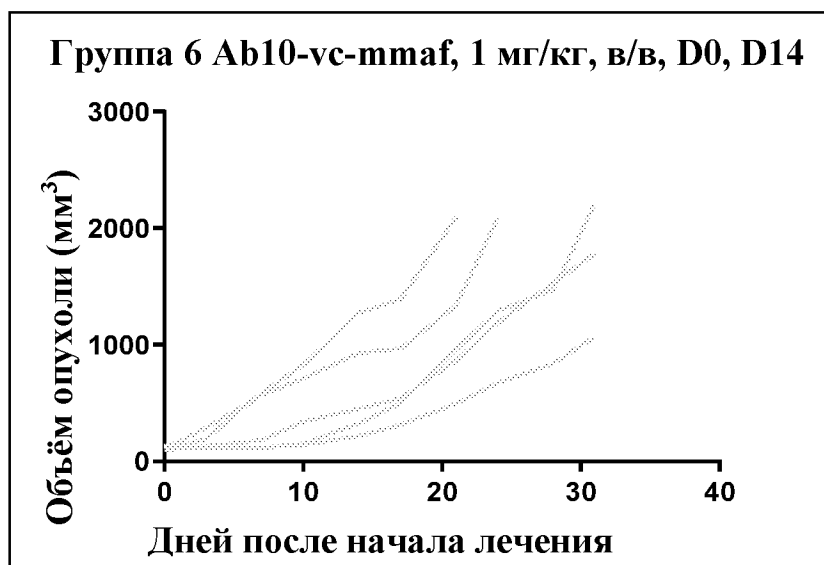
Фиг. 12Е



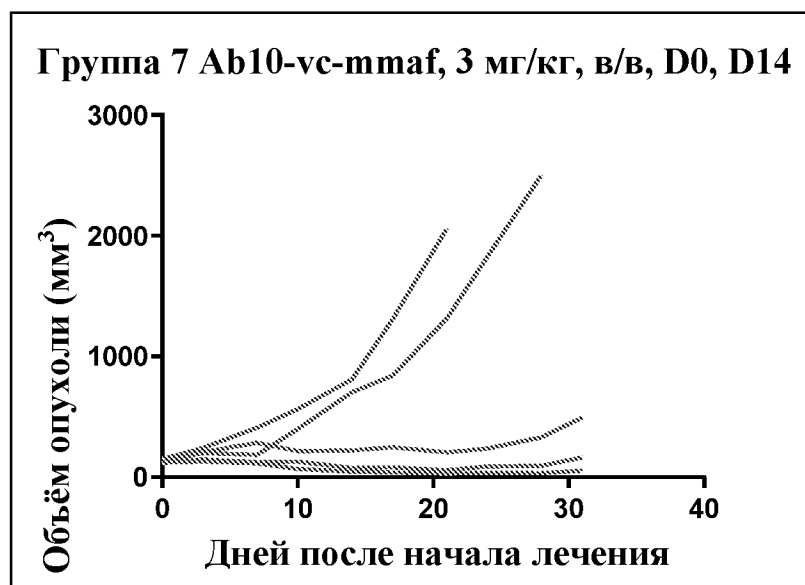
Фиг. 12F



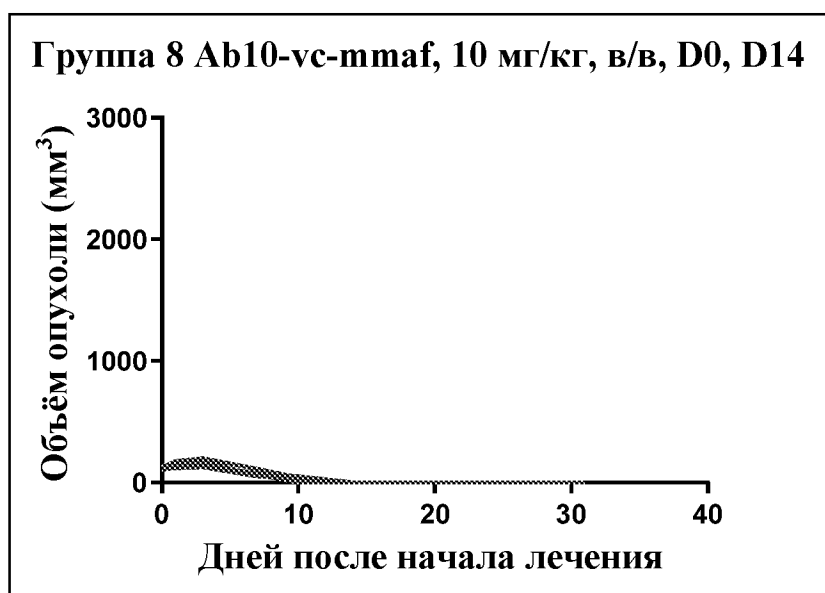
Фиг. 12G



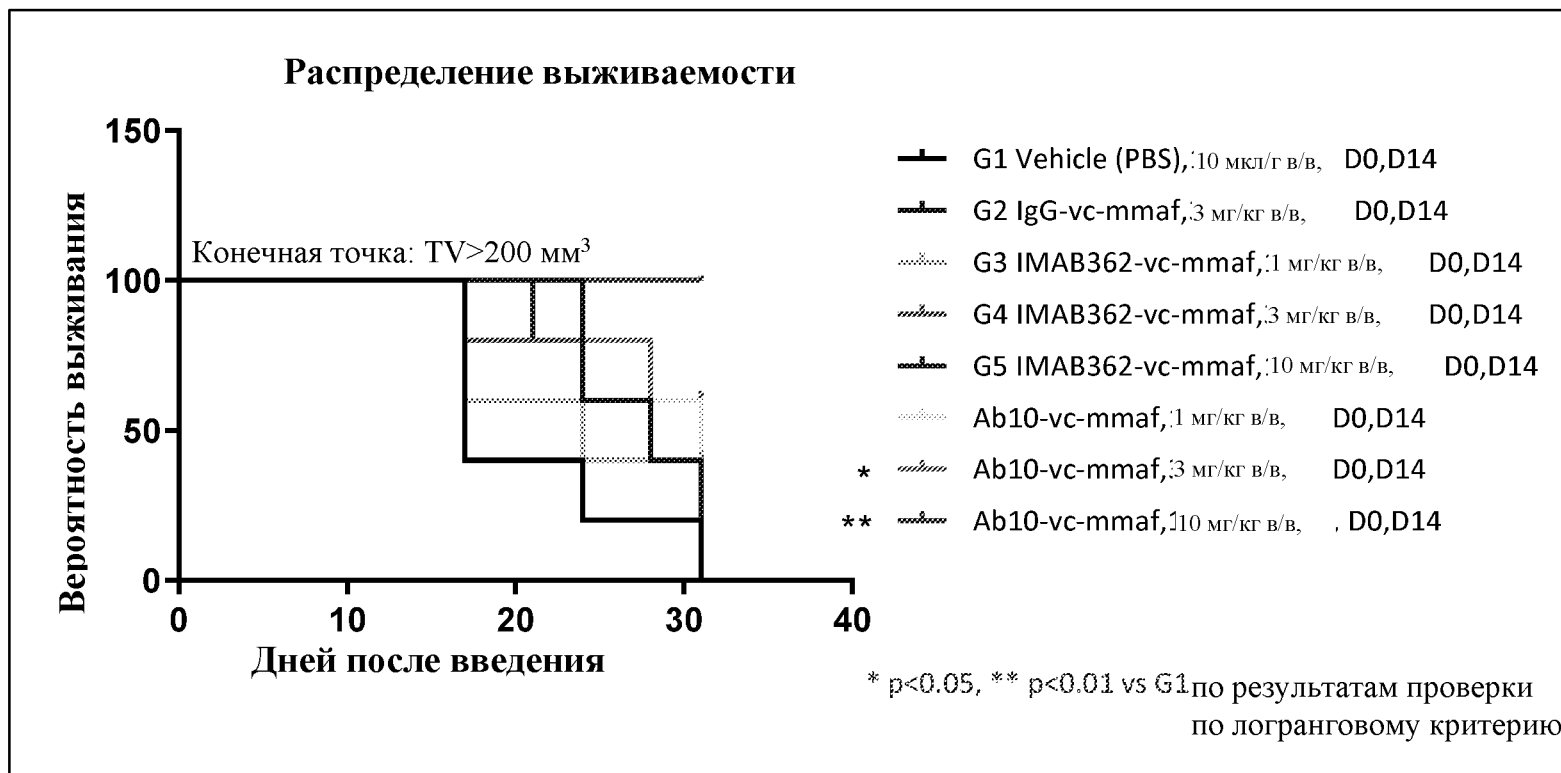
Фиг. 12Н



Фиг. 12I

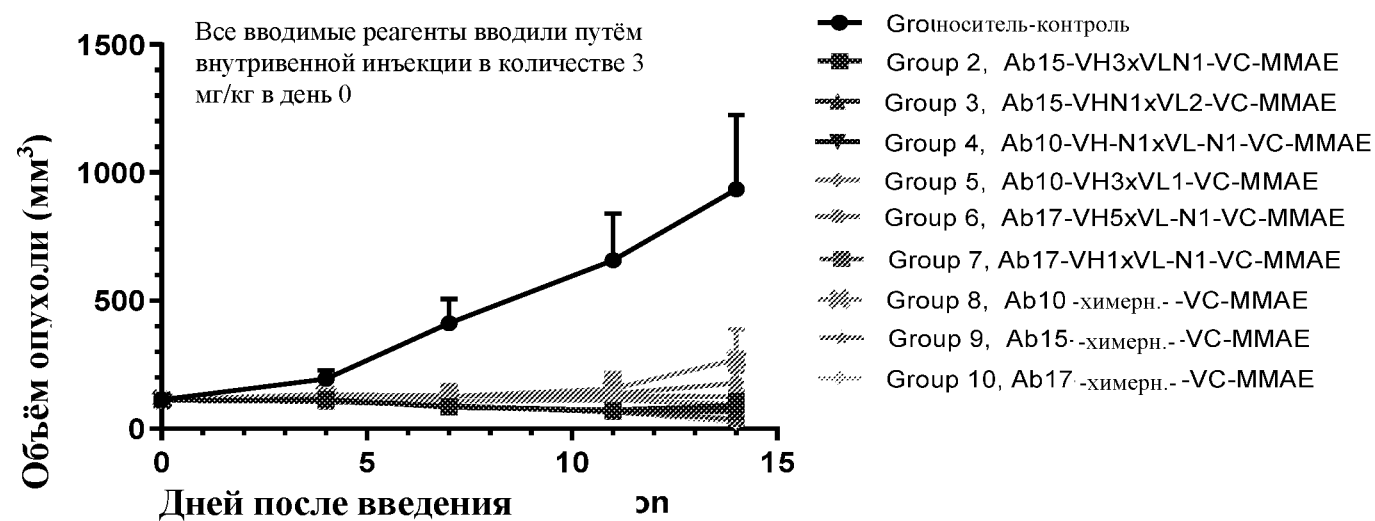


Фиг. 12J

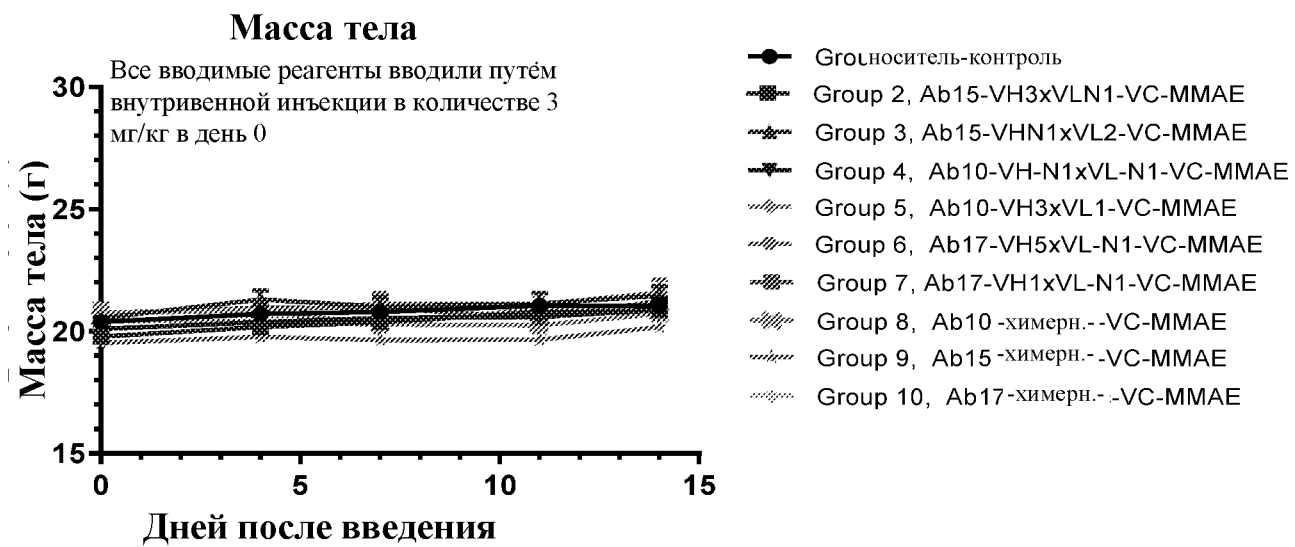


Фиг. 12К

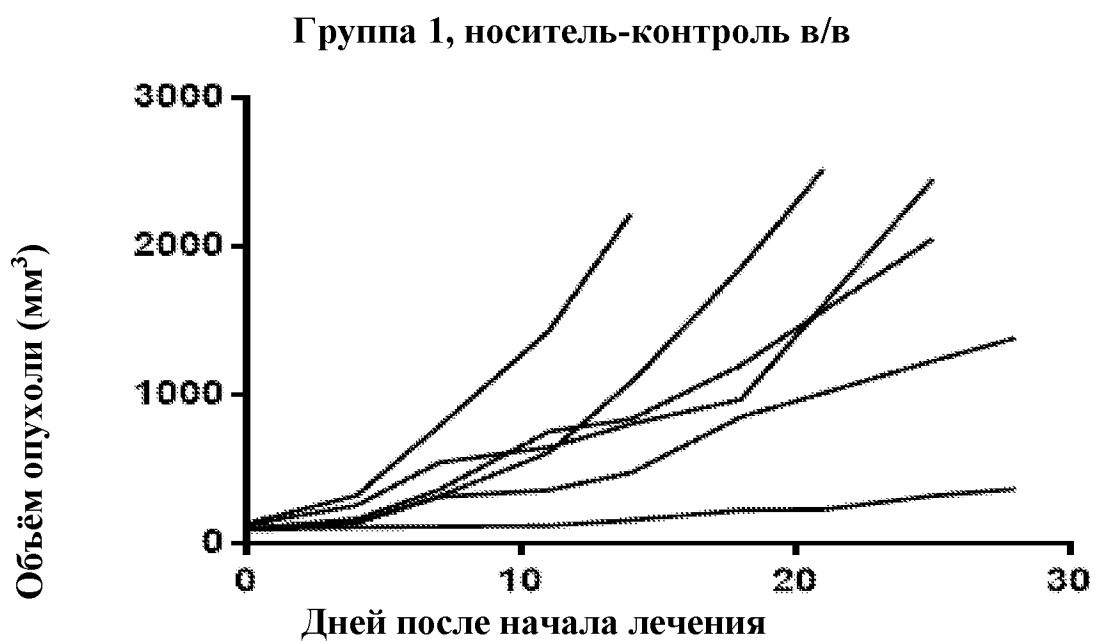
Анализ эффективности ADC на клетках GAXC031 *in vivo*



Фиг. 13А

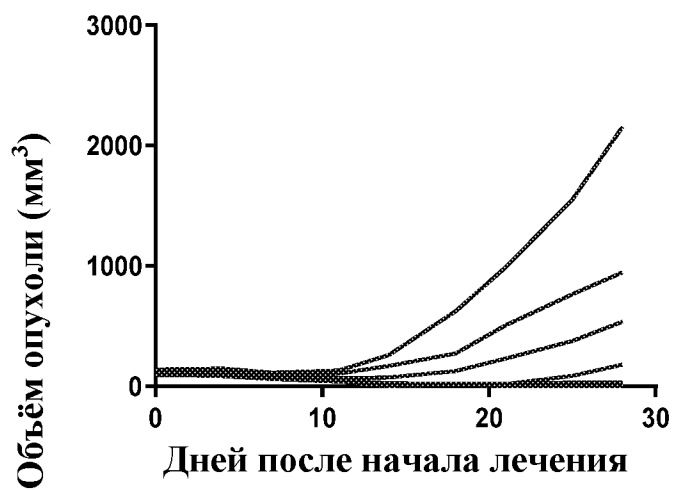


Фиг. 13В 3В



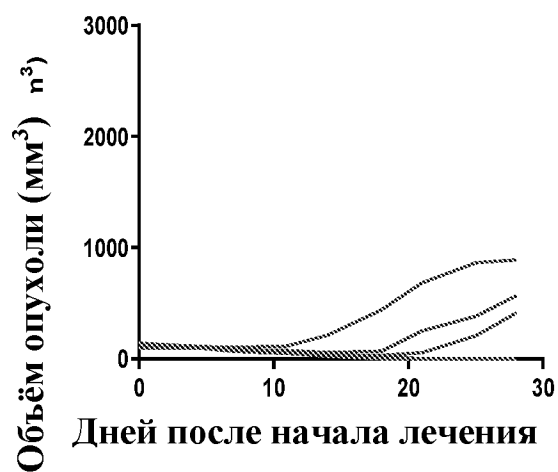
Фиг. 13С

Группа 2, Ab15-VH3xVLN1-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



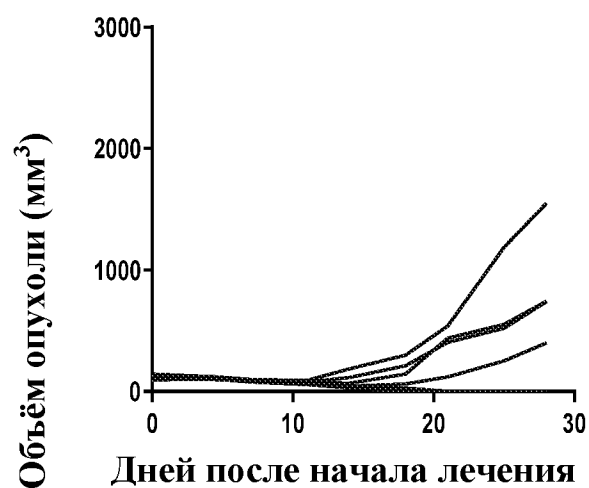
Фиг. 13D

Группа 3, Ab15-VHN1xVL2-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



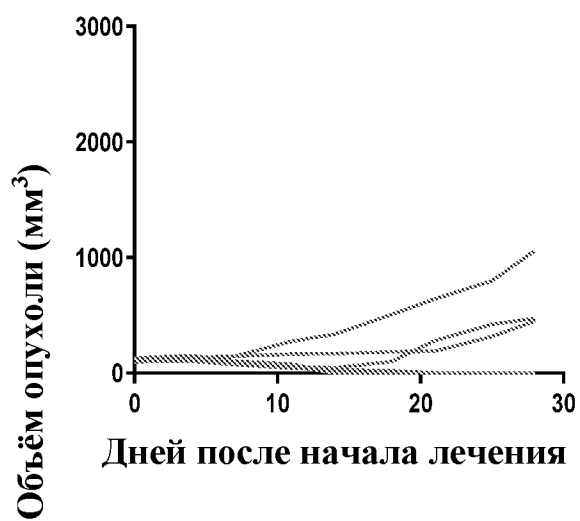
Фиг. 13Е

Группа 4, Ab10-VH-N1xVL-N1-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



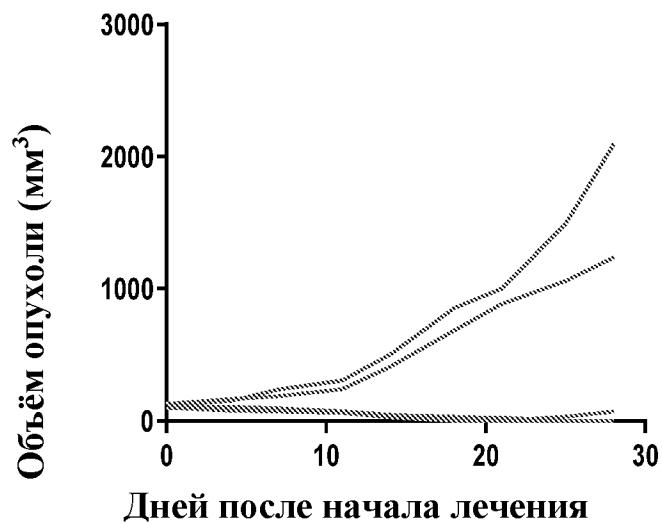
Фиг. 13F

Группа 5, Ab10-VH3xVL1-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



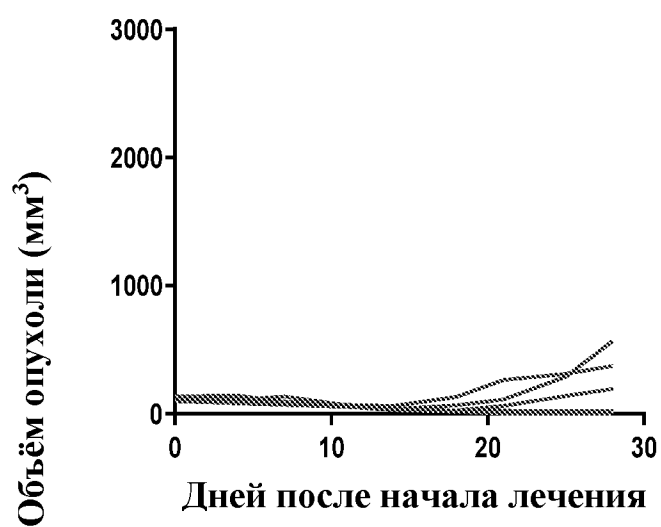
Фиг. 13G

Группа 6, Ab17-VH5xVL-N1-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



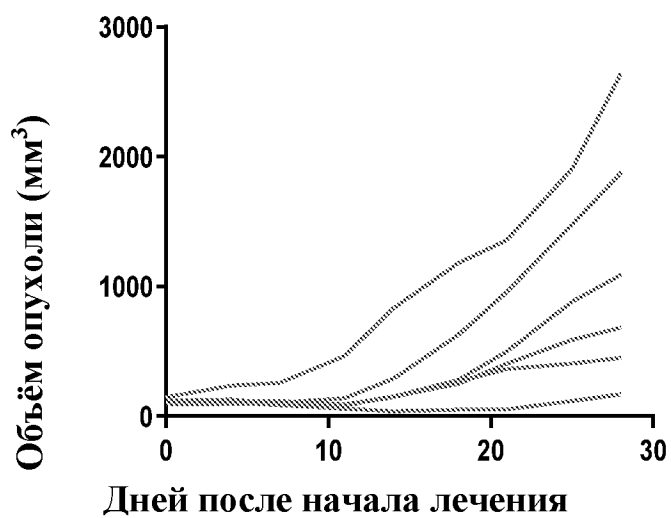
Фиг. 13H

Группа 7, Ab17-VH1xVL-N1-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в

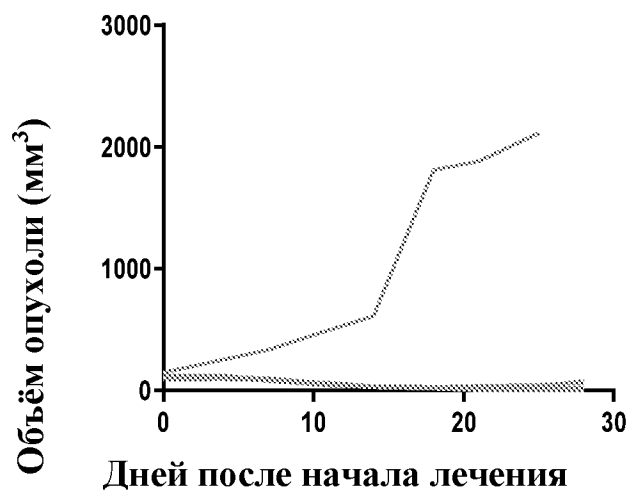
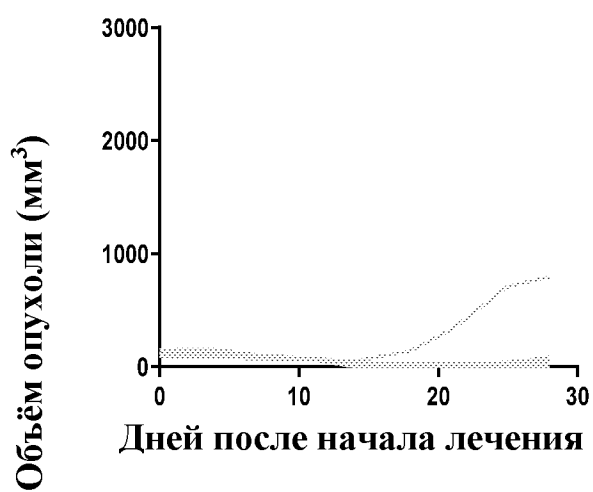


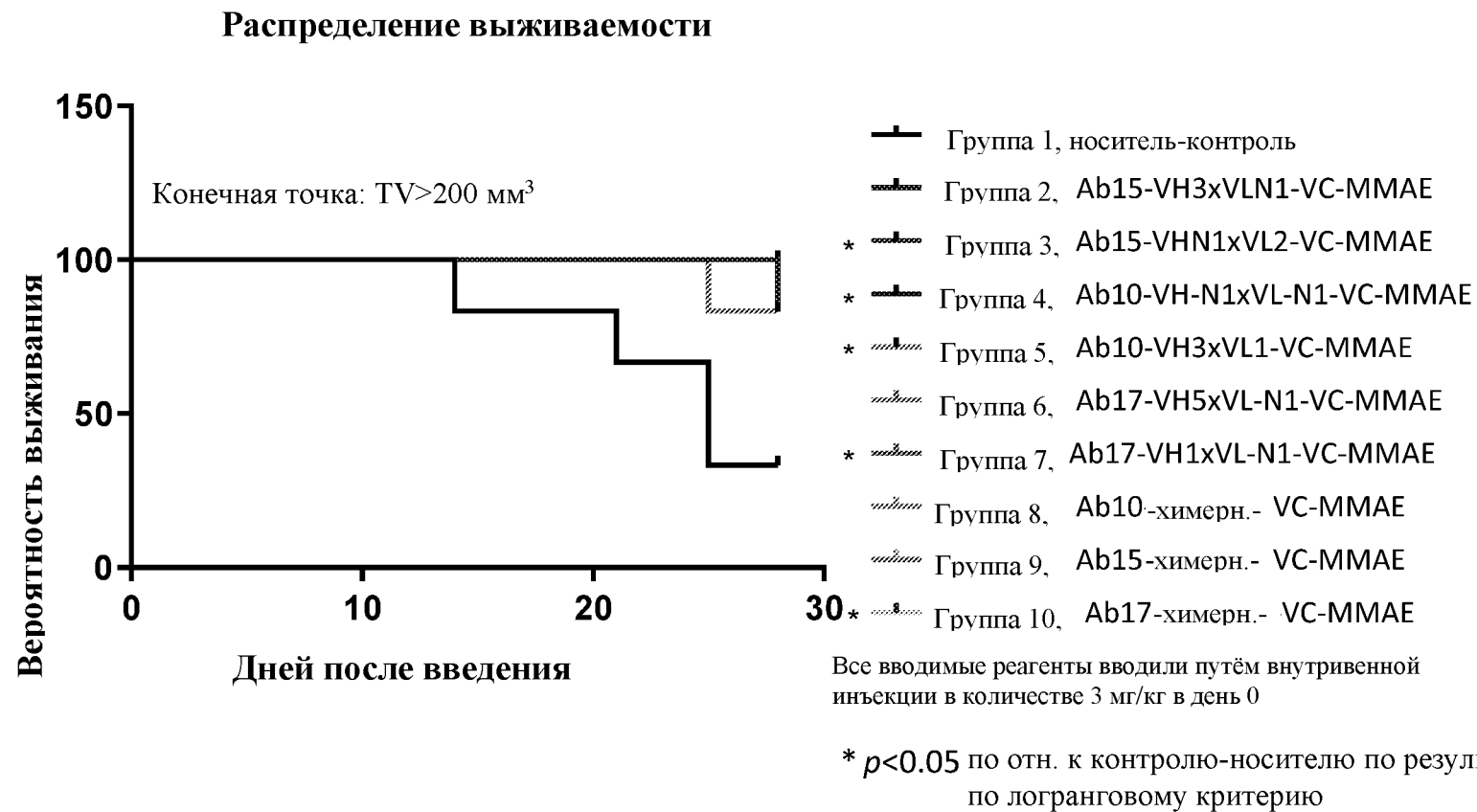
Фиг. 13I

Группа 8, Ab10-химерн.-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в



Фиг. 13J

Группа 9, Ab15-химерн.-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в**Фиг. 13K****Группа 10, Ab17-химерн.-VC-MMAE, 3 мг/кг в/в****Фиг. 13L**



Фиг. 13М