

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21)

202393553

(13)

A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.20

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

(22) Дата подачи заявки
2022.06.15

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С CLDN18.2 И CD3

(31) PCT/EP2021/066141

(32) 2021.06.15

(33) EP

(86) PCT/EP2022/066299

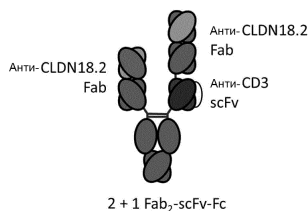
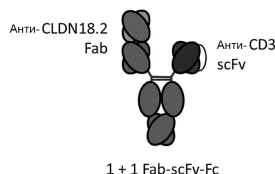
(87) WO 2022/263508 2022.12.22

(71) Заявитель:
АСТЕЛЛАС ФАРМА ЮРОП БВ (NL);
КСЕНКОР, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Бернетт Мэттью, Нисталь Алекс, Мур
Грегори (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются связывающие агенты, содержащие по меньшей мере два связывающих домена, где первый связывающий домен обладает специфичностью в отношении CLDN18.2, а второй связывающий домен обладает специфичностью в отношении CD3, а также способы применения этих связывающих агентов или кодирующих их нуклеиновых кислот при лечении рака.



A1

202393553

202393553

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С CLDN18.2 И CD3

Рак желудка и пищевода (гастроэзофагеальный; ГЭ) относится к числу злокачественных новообразований, в отношении которых существует наиболее неудовлетворенная медицинской потребностью. Рак желудка является третьей по значимости причиной смертности от рака в мире (Prz Gastroenterol. 2019; 14(1): 26–38). Заболеваемость раком пищевода увеличилась в последние десятилетия, что совпало со сдвигом в гистологическом типе и локализации первичной опухоли. Аденокарцинома пищевода в настоящее время более распространена, чем плоскоклеточная карцинома в Соединенных Штатах и Западной Европе, причем большинство опухолей локализуется в дистальном отделе пищевода. Общая пятилетняя выживаемость при ГЭ раке составляет 20-25%, несмотря на агрессивность общепринятого стандартного лечения, связанного со значительными побочными эффектами.

У большинства пациентов наблюдается местно-распространенное или метастатическое заболевание, и им необходимо пройти химиотерапию первой линии. Схемы лечения основаны на основе производных платины и фторпиримидина, в основном в сочетании с третьим соединением (например, таксаном или антрациклинами). Тем не менее, медиана выживаемости без прогрессирования от 5 до 7 месяцев и медиана общей выживаемости от 9 до 11 месяцев являются наилучшими показателями, которых можно ожидать.

Отсутствие существенной пользы от различных схем комбинированной химиотерапии нового поколения для этих видов онкологических заболеваний стимулировало исследования по использованию таргетных агентов. Недавно для лечения Her2/neu-позитивного рака пищевода был одобрен трастузумаб. Однако, поскольку только около 20% пациентов экспрессируют мишень и подходят для этого лечения, медицинская потребность по-прежнему высока.

Молекула плотного соединения клаудин 18 (CLDN18) представляет собой интегральный трансмембранный белок (тетраспанин), имеющий четыре гидрофобных участка, охватывающих мембрану, и две внеклеточные петли (петлю 1, окруженную гидрофобной областью 1 и гидрофобной областью 2; петлю 2, окруженную гидрофобными областями 3 и 4). CLDN18 существует в двух различных вариантах сплайсинга, которые описаны у мышей и у человека (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). Варианты сплайсинга (учетный номер Genbank: вариант сплайсинга 1 (CLDN18.1): NP_057453, NM_016369 и вариант сплайсинга 2 (CLDN18.2): NM_001002026,

NP_001002026) имеют молекулярную массу приблизительно 27,9/27,72 кДа. Варианты сплайсинга CLDN18.1 и CLDN18.2 отличаются N-концевой частью, которая включает первую трансмембранную (TM) область и петлю 1, тогда как первичная белковая последовательность С-конца идентична.

В нормальных тканях экспрессия CLDN18.2 не обнаруживается, за исключением желудка, где CLDN18.2 экспрессируется исключительно на короткоживущих дифференцированных эпителиальных клетках желудка. CLDN18.2 сохраняется в ходе злокачественной трансформации и поэтому часто экспонируется на поверхности клеток рака желудка человека. Более того, этот характерный для множества опухолей антиген эктопически активируется на значительных уровнях при аденокарциномах пищевода, поджелудочной железы и легкого. Белок CLDN18.2 локализуется также в метастазах аденокарциномы рака желудка в лимфатические узлы и в отдаленных метастазах, особенно в яичнике (так называемые опухоли Крукенберга).

Дифференциальная экспрессия клаудинов, таких как CLDN18.2, между клетками рака и нормальными клетками, их мембранная локализация и их отсутствие в подавляющем большинстве нормальных тканей, имеющих отношение к токсичности, делает эти молекулы привлекательными мишенями для иммунотерапии онкологических заболеваний, а применения терапии на основе антител для нацеливания на CLDN18.2 в терапии онкологических заболеваний обещает высокий уровень терапевтической специфичности.

Химерное антитело IgG1 IMAB362 (золбетуксимаб (ранее называвшееся клаудиксимаб)), направленное против CLDN18.2, было разработано Ganymed Pharmaceuticals AG. IMAB362 распознает первый внеклеточный домен (ECD1) CLDN18.2 с высокой аффинностью и специфичностью. IMAB362 не связывается ни с каким другим представителем семейства клаудинов, включая близкородственный вариант сплайсинга 1 клаудина 18 (CLDN18.1). IMAB362 проявляет точную специфичность к опухолевым клеткам и объединяет два независимых высокоэффективных механизма действия. При связывании с мишенью IMAB362 опосредует уничтожение клеток, главным образом, посредством АЗКЦ и КЗЦ. Таким образом, IMAB362 эффективно лизирует CLDN18.2-положительные клетки, включая клеточные линии рака желудка человека *in vitro* и *in vivo*. Противоопухолевая эффективность IMAB362 была продемонстрирована на мышах с ксенотрансплантированными опухолями, инокулированными клеточными линиями CLDN18.2-положительного рака.

Антитела IgG1 обычно взаимодействуют с клеточной иммунной системой посредством взаимодействия домена Fc с рецепторами Fcγ (FcγR), экспрессируемыми на

различных иммунных клетках, включая естественные клетки-киллеры, которые являются основными агентами АЗКЦ. Однако моноклональные антитела IgG1 (мАт), запускающие АЗКЦ, сталкиваются с рядом ограничений, включая широкое распространение вариантов рецептора Fc с низкой аффинностью в популяции (до 80%), а также модификации IgG1 *in vivo*, снижающие эффективность моноклональных антител (Chames et al., (2009) Br J Pharmacol, 157(2):220-233). Терапевтическим антителам также приходится конкурировать с IgG пациента, что приводит к необходимости высоких доз моноклональных антител *in vivo*. Кроме того, терапевтические антитела могут взаимодействовать с FcγRIIb (ингибирующим FcγR, экспрессируемым В-клетками, макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами), что приводит к отрицательной передаче сигналов, что снижает их эффективность.

Целью изобретения было создание новых агентов и способов терапии онкологических заболеваний.

Решение проблемы, лежащей в основе изобретения, основано на концепции создания связывающего агента, содержащего по меньшей мере один связывающий домен, специфичный для CLDN18.2, т.е. клеток злокачественной опухоли. Связывающий агент также содержит связывающий домен, который характерен для антигена CD3, специфического для Т-клеток, позволяющего связываться с Т-клетками и вовлекать Т-клетки в комплекс, что позволяет направить цитотоксический эффект Т-клеток на клетки злокачественной опухоли. Образование этого комплекса может индуцировать передачу сигналов в цитотоксических Т-клетках самостоятельно или в сочетании с вспомогательными клетками, что приводит к высвобождению цитотоксических медиаторов.

Мы впервые сообщаем, что связывающие агенты, содержащие по меньшей мере один связывающий домен в формате Fab, нацеленный на CLDN18.2, и другой связывающий домен в формате scFv, нацеленный на специфичный для Т-клеток антиген, такой как CD3, могут индуцировать мощный опосредованный Т-клетками лизис и эффективны при лечении опухолевых заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В изобретении в целом предлагаются связывающие агенты, которые связываются с CLDN18.2, в частности, биспецифические связывающие агенты, которые связываются с CLDN18.2 и CD3.

В изобретении предлагается связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3, причем связывающий агент содержит по меньшей мере три полипептидные цепи, причем

первая полипептидная цепь содержит переменную область тяжелой цепи (VH), полученный из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VH(CLDN18.2)), вторая полипептидная цепь содержит переменную область VH, полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VH(CD3)) и переменную область легкой цепи (VL), полученной из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VL(CD3)), а третья полипептидная цепь содержит VL, полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VL(CLDN18.2)).

В одном воплощении связывающий агент по изобретению представляет собой биспецифический тримерный связывающий агент.

В одном воплощении первая полипептидная цепь содержит константную область 1 тяжелой цепи (CH1), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта.

В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи содержат константную область 2 тяжелой цепи (CH2), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта, и константную область 3 тяжелой цепи (CH3), полученную из иммуноглобулина или его функциональный вариант.

В одном воплощении третья полипептидная цепь содержит константную область легкой цепи (CL), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта.

В одном воплощении VH и CH1, CH2 и CH3 в первой полипептидной цепи расположены от N-конца к С-концу в порядке VH(CLDN18.2)-CH1-CH2-CH3.

В одном воплощении VH, VL и CH2 и CH3 на второй полипептидной цепи расположены от N-конца к С-концу в порядке VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3.

В одном воплощении первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью. В одном воплощении VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, а VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3.

В одном воплощении CH2 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH2 на второй полипептидной цепи и/или CH3 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH3 на второй полипептидной цепи. В одном воплощении CH1 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CL на третьей полипептидной цепи.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению содержит дополнительный связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2, при этом вторая полипептидная цепь дополнительно содержит VH(CLDN18.2) и при этом связывающий

агент содержит четвертую полипептидную цепь, идентичную третьей полипептидной цепи.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению представляет собой биспецифический тетрамерный связывающий агент.

В одном воплощении вторая полипептидная цепь дополнительно содержит CH1, полученный из иммуноглобулина или его функционального варианта.

В одном воплощении иммуноглобулин представляет собой IgG1, предпочтительно IgG1 человека. В одном воплощении в описанном в данной заявке связывающем агенте VH(CLDN18.2) и/или VL(CLDN18.2) происходят из IgG1, VH(CD3) и/или VL(CD3) происходят из IgG1, и/или CH1, CH2, CH3 и/или CL происходят из IgG1, где IgG1 предпочтительно представляет собой IgG1 человека.

В одном воплощении VH, VL и CH1, CH2 и CH3 на второй полипептидной цепи расположены от N-конца к C-концу в порядке VH(CLDN18.2)-CH1-VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или VH(CLDN18.2)-CH1-VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3.

В одном воплощении вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

В одном воплощении VH(CLDN18.2) на второй полипептидной цепи взаимодействует с VL(CLDN18.2) на четвертой полипептидной цепи с образованием дополнительного связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2.

В одном воплощении CH1 на второй полипептидной цепи взаимодействует с CL на четвертой полипептидной цепи.

В одном воплощении VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 и 61.

В одном воплощении VH(CD3) содержит

(i) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKANNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 50) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант,

(ii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDEYVSWFAY (SEQ ID NO: 51) или ее функциональный вариант, или

(iii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант.

В одном воплощении VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55.

В одном воплощении VL(CD3) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 46) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 47) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 48) или ее функциональный вариант.

В одном воплощении VH(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39.

В одном воплощении VH(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 32) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность NIYPSDSYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 33) или его функциональный вариант и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SWRGNSFDY (SEQ ID NO: 34) или его функциональный вариант.

В одном воплощении VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42.

В одном воплощении VL(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 35) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 36) или его функциональный вариант и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNDYSYPFT (SEQ ID NO: 37) или его функциональный вариант.

В одном воплощении

(i) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 58, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, а VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42,

(ii) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 61, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, и VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42, или

(iii) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 54, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, а VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42.

В одном воплощении VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 58, или ее функционального варианта, VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта, VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42 или ее функционального варианта.

В одном воплощении VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 61, или ее функционального варианта, VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта, VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42 или ее функционального варианта.

В одном воплощении VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 54, или ее функционального варианта, VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта, VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42 или ее функционального варианта.

В одном воплощении в первой полипептидной цепи CH1 соединен с CH2 пептидным линкером. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 27) или ее функциональный вариант.

В одном воплощении VH(CD3) или VL(CD3) соединены с CH2 посредством пептидного линкера. В одном воплощении VH(CD3) или VL(CD3) соединены с CH1 посредством пептидного линкера. В одном воплощении пептидный линкер включает

аминокислотную последовательность (G4S)_x или ее функциональный вариант, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (G4S)₂ (SEQ ID NO: 26) или ее функциональный вариант. В одном воплощении пептидный линкер, соединяющий VH(CD3) или VL(CD3) и CH2, включает аминокислотную последовательность KTHTCPPCP (SEQ ID NO: 21) или ее функциональный вариант. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (G4S)₂KTHTCPPCP (SEQ ID NO: 23) или ее функциональный вариант. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 22) или ее функциональный вариант.

В одном воплощении VH(CD3) и VL(CD3) соединены друг с другом пептидным линкером. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (GKPGS)_x или ее функциональный вариант, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6. В одном воплощении пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 11) или ее функциональный вариант.

В некоторых воплощениях домены CH1, CH2 и/или CH3 связывающего агента по изобретению содержат одну или несколько модификаций аминокислот, в частности замен и/или делеций, в положениях, соответствующих положениям IgG1 человека согласно нумерации EU. В одном воплощении CH1 в первой и/или второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток аспарагиновой кислоты в положении 208 согласно нумерации EU. В одном воплощении CH1 на первой полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток аспарагиновой кислоты в положении 208 согласно нумерации EU, а CH1 на второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток аспарагина в положении 208 согласно нумерации EU.

Кроме того, в некоторых воплощениях связывающий агент по изобретению по существу, не связывается например, детектируемо, с человеческими FcγRI, IIa, IIb и/или IIIa. В одном воплощении CH2 в первой и/или второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую одно или несколько из следующих: остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делеция в положении 236, остаток лизина в положении 267 и остаток глутаминовой кислоты в положении 295 согласно нумерации EU. В одном воплощении CH2 в первой и второй полипептидной цепи содержат аминокислотную последовательность, содержащую остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делецию в положении 236 и остаток

лизина в положении 267 согласно нумерации EU, и где СН2 в первой полипептидной цепи дополнительно содержит остаток глутаминовой кислоты в положении 295 согласно нумерации EU, а СН2 во второй полипептидной цепи дополнительно содержит остаток глутамин в положении 295 согласно нумерации EU.

В одном воплощении СН3 в первой и/или второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую одно или несколько из следующих: остаток глутамин в положении 357, остаток лизина в положении 364, остаток аспарагиновой кислоты в положении 368, остаток серина в положении 370, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 согласно нумерации EU. В одном воплощении СН3 в первой полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток глутаминовой кислоты в положении 357, остаток серина в положении 364, остаток аспарагиновой кислоты в положении 368, остаток серина в положении 370, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 согласно нумерации EU, а СН3 во второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток глутамин в положении 357, остаток лизина в положении 364, остаток лейцина в положении 368, остаток лизина в положении 370, остаток аспарагина в положении 384, остаток глутамин в положении 418 и остаток аспарагина в положении 421 согласно нумерации EU.

В одном воплощении первая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28, или ее функциональный вариант. В одном воплощении вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 30, или ее функциональный вариант. В одном воплощении вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 29, или ее функциональный вариант. В одном воплощении третья полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31, или ее функциональный вариант.

В одном воплощении первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73, или ее функционального варианта. В одном воплощении вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, 75, 76 и 77 или ее функционального варианта. В одном воплощении третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

Предпочтительно, в одном воплощении: (i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 75 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

Предпочтительно, в одном воплощении: (i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 74 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

Предпочтительно, в одном воплощении: (i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 76 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

Предпочтительно, в одном воплощении: (i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 77 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

В изобретении также предлагается связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2, содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VH(CLDN18.2)) и переменную область легкой цепи (VL), полученной из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VL(CLDN18.2)), где VH(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 32) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность

NIYPSDSYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 33) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SWRGNSFDY (SEQ ID NO: 34) или ее функциональный вариант, и VL(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KSSQSLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 35) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 36) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNDYSYPFT (SEQ ID NO: 37) или ее функциональный вариант. В одном воплощении связывающий агент дополнительно включает связывающий домен, специфичный к CD3. В одном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 содержит VH, полученный из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VH(CD3)) и VL, полученный из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VL(CD3)), где VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 и 61, а VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55.

В одном воплощении функциональный вариант аминокислотной последовательности NIYPSDSYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 33) содержит или сохраняет аминокислотные остатки QG.

В одном воплощении связывающий агент имеет формат полноразмерного антитела или фрагмента антитела. В одном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 имеет формат фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или фрагмента scFv. В одном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 имеет формат фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или фрагмента scFv.

В одном воплощении связывающий агент представляет собой биспецифическую молекулу, такую как биспецифическое антитело. В одном воплощении связывающий агент представляет собой биспецифическое одноцепочечное антитело. В одном воплощении связывающий агент способен моновалентно или бивалентно связываться с CLDN18.2. В одном воплощении связывающий агент содержит два связывающих домена, специфичных к CLDN18.2. В одном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 имеет формат фрагмента Fab, а связывающий домен со специфичностью к CD3 имеет формат фрагмента scFv. В одном воплощении VH(CLDN18.2) соединен с VL(CLDN18.2) с помощью пептидного линкера и/или VH(CD3) соединен с VL(CD3) с помощью пептидного линкера, такого как пептидный линкер, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-20.

В изобретении также предлагается связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3, причем связывающий агент содержит по меньшей мере четыре полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 74 или ее функциональный вариант, третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78 или ее функциональный вариант, а четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи. В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента и/или домены на полипептидных цепях связывающего агента взаимодействуют друг с другом, как описано в настоящей заявке. В одном воплощении первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

В изобретении также предлагается связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3, причем связывающий агент содержит по меньшей мере три полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 75 или ее функциональный вариант, а третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78 или ее функциональный вариант. В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента и/или домены на полипептидных цепях связывающего агента взаимодействуют друг с другом, как описано в настоящей заявке. В одном воплощении первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью.

В изобретении также предлагается связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3, причем связывающий агент содержит по меньшей мере четыре полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 76 или ее

функциональный вариант, третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78 или ее функциональный вариант, а четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи. В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента и/или домены на полипептидных цепях связывающего агента взаимодействуют друг с другом, как описано в настоящей заявке. В одном воплощении первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

В изобретении также предлагается связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3, причем связывающий агент содержит по меньшей мере четыре полипептидные цепи, причем первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 77 или ее функциональный вариант, третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78 или ее функциональный вариант, а четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи. В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента и/или домены на полипептидных цепях связывающего агента взаимодействуют друг с другом, как описано в настоящей заявке. В одном воплощении первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

В одном воплощении VH(CLDN18.2), VL(CLDN18.2), VH(CD3) и/или VL(CD3) гуманизированы.

В одном воплощении CD3 экспрессируется на поверхности Т-клеток. В одном воплощении связывающий агент по изобретению связывается с эpsilon-цепью CD3. В одном воплощении связывание связывающего агента с CD3 на Т-клетках приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток. В одном воплощении пролиферация и/или активация Т-клеток включает пролиферацию и/или активацию CD4 и/или CD8 Т-клеток, предпочтительно CD107a⁺ Т-клеток. В одном воплощении указанные пролиферированные и/или активированные Т-клетки способны к дегрануляции. В одном воплощении указанные активированные Т-клетки высвобождают цитотоксические факторы, например, перфорины и гранзимы, и инициируют цитолиз и/или апоптоз клеток злокачественной опухоли.

В одном воплощении CLDN18.2 экспрессируется в клетках злокачественной опухоли. В одном воплощении CLDN18.2 экспрессируется на поверхности клеток злокачественной опухоли. В одном воплощении связывающий агент связывается с внеклеточной частью CLDN18.2. В одном воплощении связывающий агент индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении клеток злокачественной опухоли, экспрессирующих CLDN18.2.

В одном воплощении клетки злокачественной опухоли происходят из злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичников, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и их метастаз, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

В некоторых воплощениях связывающий агент по изобретению или одна или несколько полипептидных цепей связывающего агента по изобретению содержат или не содержат сигналы секреции, такие как N-концевые сигналы секреции, в частности сигналы иммуноглобулина, такие как сигналы секреции IgG, такие как последовательность MGWSCIILFLVATATGVHS и/или содержит или не содержит метки, в частности C-концевые метки, такие как His-метки, в частности последовательность Gly-Gly-Ser-(His)₆ или (His)₆, или Strep-метку.

В некоторых воплощениях связывающий агент по изобретению содержит одну или несколько посттрансляционных модификаций. В изобретении также предлагается связывающий агент, который получен из одной или нескольких посттрансляционных модификаций описанного в данной заявке связывающего агента. В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций выбраны из пироглутамилирования на N-конце одного или нескольких VH(CLDN18.2), пироглутамилирования на N-конце VH(CD3), делеции лизина на C-конце первой полипептидной цепи и делеции лизина на C-конце второй полипептидной цепи.

В изобретении также предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая полипептидную цепь связывающего агента по изобретению. В изобретении также предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая связывающий агент по изобретению. В изобретении также предлагается набор нуклеиновых кислот, вместе кодирующих связывающий агент по изобретению.

В изобретении также предлагается вектор, содержащий нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот по изобретению. В изобретении также предлагается набор

векторов, включающий набор нуклеиновых кислот по изобретению. В одном воплощении каждая нуклеиновая кислота из набора нуклеиновых кислот содержится в векторе из набора векторов. В одном воплощении вектор или набор векторов способны экспрессировать связывающий агент.

В одном воплощении нуклеиновая кислота функционально связана с любым количеством регуляторных элементов (промоторов, точки начала репликации, селективируемых маркеров, сайтов связывания рибосом, индукторов и т.д.). Вектор может быть экспрессирующим вектором и может быть внехромосомным или интегрирующим вектором. В некоторых воплощениях каждая нуклеиновая кислота, кодирующая полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, содержится в одном экспрессирующем векторе. Нуклеиновые кислоты могут находиться под контролем разных или одних и тех же промоторов. В таких воплощениях для стимулирования образования связывающего агента по изобретению можно использовать различные соотношения векторов.

В изобретении также предлагается клетка-хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту, набор нуклеиновых кислот, вектор или набор векторов. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из клеток СНО, клеток ВНК, клеток HeLa, клеток COS, клеток НЕК293, клеток НЕК293 Т и т.п. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, грибную клетку, растительную клетку или клетку насекомого.

В изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая связывающий агент по изобретению, нуклеиновую кислоту по изобретению, набор нуклеиновых кислот по изобретению, вектор по изобретению, набор векторов по изобретению или клетку-хозяина по изобретению. В одном воплощении фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

В изобретении также предлагается связывающий агент по изобретению, нуклеиновая кислота по изобретению, набор нуклеиновых кислот по изобретению, вектор по изобретению, набор векторов по изобретению, клетка-хозяин по изобретению или фармацевтическая композиция по изобретению для применения в терапии.

В изобретении также предлагается связывающий агент по изобретению, нуклеиновая кислота по изобретению, набор нуклеиновых кислот по изобретению, вектор по изобретению, набор векторов по изобретению, клетка-хозяин по изобретению или

фармацевтическая композиция по изобретению для применения при лечении или профилактике рака.

В изобретении также предлагается способ лечения или профилактики рака, включающий введение связывающего агента по изобретению, нуклеиновой кислоты по изобретению, набора нуклеиновых кислот по изобретению, вектора по изобретению, набора векторов по изобретению, клетку-хозяина по изобретению или фармацевтическую композицию по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В одном воплощении злокачественная опухоль включает клетки злокачественной опухоли, экспрессирующие CLDN18.2.

В изобретении также предлагается применение связывающего агента по изобретению, нуклеиновой кислоты по изобретению, набора нуклеиновых кислот по изобретению, вектора по изобретению, набора векторов по изобретению, клетки-хозяина по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для приготовления лекарственного средства. В одном воплощении лекарственное средство предназначено для лечения или профилактики рака. В одном воплощении злокачественная опухоль включает клетки злокачественной опухоли, экспрессирующие CLDN18.2.

В одном воплощении указанный рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичников, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и их метастаза, опухоли Крукенберга, метастаз в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

В изобретении также предлагается связывающий агент, нуклеиновая кислота, набор нуклеиновых кислот, вектор, набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция, как описано в данной заявке, для применения в способах лечения, описанных в данной заявке. В одном воплощении предлагается способ лечения или профилактики такого заболевания, как рак, включающий введение связывающего агента по изобретению, нуклеиновой кислоты по изобретению, набора нуклеиновых кислот по изобретению, вектора по изобретению, набора векторов по изобретению, клетки-хозяина по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению субъекту, имеющему заболевание, например, субъекту, имеющему рак. Предпочтительно заболевание включает клетки, такие как больные клетки, экспрессирующие CLDN18.2. Предпочтительно заболевание представляет собой злокачественную опухоль, и злокачественная опухоль включает клетки злокачественной опухоли, экспрессирующие CLDN18.2.

Согласно изобретению CLDN18.2 предпочтительно имеет аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1.

В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь не содержит VL(CLDN18.2). В некоторых воплощениях третья полипептидная цепь не содержит VH(CLDN18.2).

В некоторых воплощениях связывающий домен(ы) связывающего агента со специфичностью к CLDN18.2 имеют форму Fab-фрагмента. В некоторых воплощениях связывающий домен связывающего агента по изобретению, специфичный к CD3, имеет формат фрагмента scFv.

В некоторых воплощениях связывающий агент по изобретению не связывается с CLDN18.1. Предпочтительно связывающий агент не связывается с CLDN18.1 человека, мыши или яванского макака. В некоторых воплощениях связывающий агент по настоящему изобретению не связывается с CLDN9, таким как CLDN9 человека.

В некоторых воплощениях связывающий агент по изобретению связывается с CLDN18.2 более чем одного вида, например, с CLDN18.2 человека, мыши и яванского макака.

В некоторых воплощениях лечение пациента описанным в данной заявке связывающим агентом приводит к продлению выживаемости указанного пациента. В некоторых воплощениях связывающий агент, описанный в настоящей заявке, проявляет одну или несколько иммунных эффекторных функций. В некоторых воплощениях указанная одна или несколько иммунных эффекторных функций выбраны из группы, состоящей из комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (АЗКФ), индукции апоптоза, и ингибирование пролиферации. Описанные в данной заявке связывающие агенты предпочтительно способны перенаправлять Т-клетки на атаку клеток злокачественной опухоли и, таким образом, способны действовать посредством перенаправленной цитотоксичности Т-клеток (redirected T cell cytotoxicity, RTCC). В некоторых воплощениях связывающий агент не способен или практически не способен индуцировать АЗКЦ. В некоторых воплощениях связывающий агент не способен или практически не способен индуцировать КЗЦ. В некоторых воплощениях связывающий агент не способен или практически не способен индуцировать АЗКФ. В некоторых воплощениях связывающий агент способен уменьшать, предпочтительно значительно уменьшать, рост и/или объем опухоли у субъекта, такого как пациент.

В изобретении также предлагаются способы получения связывающего агента по изобретению. В одном воплощении способ получения связывающего агента по изобретению включает трансфекцию клетки-хозяина нуклеиновой кислотой по изобретению, набором нуклеиновых кислот по изобретению, вектором по изобретению или набором векторов по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую связывающий агент по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин совместно экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую первую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин дополнительно экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую третью полипептидную цепь связывающего агента по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин дополнительно экспрессирует нуклеиновую кислоту, кодирующую четвертую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению. В одном воплощении указанная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы) содержится(атся) в векторе или наборе векторов. В одном воплощении клетка-хозяин экспрессирует все полипептидные цепи связывающего агента по изобретению. В одном воплощении клетка-хозяин после трансфекции продуцирует связывающий агент по изобретению, предпочтительно при выращивании в подходящих условиях для продуцирования связывающего агента, таких как описанные в данной заявке или известные в данной области техники. В одном воплощении связывающий агент по изобретению можно получить из клетки-хозяина.

Таким образом, в одном воплощении способ получения связывающего агента по изобретению включает стадии трансфекции клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей первую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, нуклеиновой кислотой, кодирующей вторую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, нуклеиновую кислоту, кодирующую третью полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, и необязательно нуклеиновую кислоту, кодирующую четвертую полипептидную цепь связывающего агента по изобретению, экспрессирующую указанные нуклеиновые кислоты в клетке-хозяине и получение связывающего агента изобретения. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из клеток CHO, клеток ВНК, клеток HeLa, клеток COS, клеток HEK293, клеток HEK293 Т и т.п. В одном воплощении клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, грибную клетку, растительную клетку или клетку насекомого. В одном воплощении связывающий агент получают *in vitro*. В одном воплощении

связывающий агент продуцируется *in vivo*, например, у субъекта, подлежащего лечению, такого как субъект, страдающий заболеванием, в частности заболеванием, связанным с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, например, онкологическим заболеванием. В одном воплощении первая и/или вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению продуцируется, например, в клетке-хозяине, а третья полипептидная цепь продуцируется, например, в другой клетке-хозяине. В одном воплощении все полипептидные цепи связывающего агента по изобретению продуцируются в одной и той же клетке-хозяине.

В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента по изобретению связаны друг с другом, например, ковалентно. В одном воплощении полипептидные цепи связывающего агента получают в виде одного полипептида, содержащего все полипептидные цепи связывающего агента. В одном воплощении по меньшей мере две полипептидные цепи связывающего агента связаны вместе и образуются в виде одного полипептида. В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи связаны вместе и продуцируются как один полипептид, а третья полипептидная цепь продуцируется как отдельный полипептид. В одном воплощении третья и первая полипептидные цепи связаны вместе и продуцируются как один полипептид, а вторая полипептидная цепь продуцируется как отдельный полипептид. В одном воплощении вторая и третья полипептидные цепи связаны вместе и продуцируются как один полипептид, а первая полипептидная цепь производится как отдельный полипептид или связана с четвертой полипептидной цепью, и обе продуцируются вместе как один полипептид. Предпочтительно, полипептидные цепи связывающего агента по изобретению производятся отдельно, т.е. в виде отдельных полипептидов, например, в одной и той же или в разных клетках, и взаимодействуют во время или после продукции с образованием связывающего агента, например, внутри клетки или нет. внутри клетки. Предпочтительно, чтобы полипептидные цепи получали в виде отдельных полипептидов, т.е. первую полипептидную цепь получали в виде одного полипептида, вторую полипептидную цепь получали в виде одного полипептида, третью полипептидную цепь получали в виде одного полипептида и необязательно четвертую полипептидную цепь получали в виде одного полипептида, и полипептидные цепи по изобретению взаимодействуют с образованием связывающего агента по изобретению. В одном воплощении введение связывающего агента по настоящему изобретению включает введение первой, второй, третьей и, необязательно, четвертой полипептидной цепи, составленной в носителе, таком как липидная наночастица, липосома, липоплекс и т.д. В одном воплощении первую и вторую полипептидные цепи вводят вместе, например, включенные в состав в одном и

том же или в разных носителях, а третью полипептидную цепь вводят, например, включенную в состав отдельно, например, в носитель. В одном воплощении четвертую полипептидную цепь дополнительно вводят, например, включенную в состав отдельно, например, в носитель. В одном воплощении третью и четвертую полипептидные цепи вводят вместе, например, включенную в состав в одном и том же или в разных носителях. В одном воплощении все пептидные цепи связывающего агента по изобретению включены в состав вместе в одном носителе. В одном воплощении каждая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению содержится в отдельном носителе, причем носители могут быть одинаковыми или разными.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут видны из следующих подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 изображен А) формат «Fab-scFv», который включает VH, рекомбинантно слитый с одной стороной гетеродимерного Fc (первая полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке), одноцепочечный Fv («scFv»), рекомбинантно слит с другой стороной гетеродимерного Fc (вторая полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке) и легкой цепью (LC; третья полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке), трансфицированных по отдельности, так что образуется Fab-домен с VH первой полипептидной цепи; и В) формат «Fab2-scFv», который включает VH, рекомбинантно слитый с одной стороной гетеродимерного Fc (первая полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке), VH, рекомбинантно слитый с scFv, объединенный с другой стороной гетеродимерного Fc (первая полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке) вторая полипептидная цепь, описанная в настоящей заявке), и LC (третья и четвертая полипептидные цепи, описанные в настоящей заявке), трансфицированные отдельно, так что Fab-домены образуются с VH первой полипептидной цепи и дополнительным VH второй полипептидной цепи.

На фигуре 2 показано связывание биспецифических анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антител, содержащих мышиный CLDN18.2 АСД, с А) клетками КР-4 и В) клетками NUGC-4. Контроли включали бсАт против RSV x анти-CD3, только клетки и только вторичное антитело. Данные показывают, что анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт дозозависимо связываются с клетками NUGC-4, почти не связываясь с клетками КР-4 во всех протестированных концентрациях. Примечательно, что бсАт формата «Fab2-scFv» (т.е. XENP24647, XENP24648 и XENP24649) гораздо сильнее связывались с клетками NUGC-4 по сравнению с бсАт формата «Fab-scFv» (т.е. XENP24645 и XENP24646), вероятно, из-за дополнительной авидности, придаваемой форматом «Fab2-scFv».

На фигуре 3 изображена индукция RTCC на А) клетках KP-4 и В) клетках NUGC-4 с помощью анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт, имеющих мышиный CLDN18.2 АСД. Данные показывают, что прототип анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт дозозависимо индуцировали RTCC на NUGC-4 и не индуцировали RTCC на клетках KP-4.

На фигуре 4 показаны уровни экспрессии на А) клетках NUGC-4 и В) клетках SNU-601, определенные проточной цитометрией. Данные показывают, что SNU-601 экспрессирует больше CLDN18.2, чем NUGC-4.

На фигуре 5 показано связывание биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител, содержащих мышиный CLDN18.2 АСД, с А) клетками NUGC-4 и В) клетками SNU-601. Контроли включали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело, только клетки и только вторичное антитело. Данные показывают, что каждое из биспецифических антител дозозависимо связывается как с NUGC-4, так и с SNU-601, с более высоким максимальным связыванием с клетками SNU-601, чем с NUGC-4, что согласуется с соответствующими уровнями экспрессии CLDN18.2 в каждой клеточной линии.

На фигуре 6 изображена индукция RTCC (на что указывает уменьшение числа живых клеток-мишеней) на клетках А) NUGC-4 и В) SNU-601 после инкубации в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают, что биспецифические антитела усиливают уничтожение клеток-мишеней (т.е. клеток NUGC-4 и SNU-601), о чем свидетельствует уменьшение количества живых клеток.

На фигуре 7 изображена индукция RTCC (на что указывает увеличение количества мертвых клеток-мишеней) на клетках А) NUGC-4 и В) SNU-601 после инкубации в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 х анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают, что биспецифические антитела усиливают уничтожение клеток-мишеней (т.е. клеток NUGC-4 и SNU-601), на что указывает увеличение количества мертвых/умирающих клеток.

На фигуре 8 изображена индукция RTCC (на что указывает уменьшение числа живых клеток-мишеней) на клетках А) NUGC-4 и В) SNU-601 после инкубации в течение

48 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 x анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV x анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают, что биспецифические антитела усиливают уничтожение клеток-мишеней (т.е. клеток NUGC-4 и SNU-601), о чем свидетельствует уменьшение количества живых клеток.

На фигуре 9 изображена индукция RTCC (на что указывает увеличение количества мертвых клеток-мишеней) на клетках А) NUGC-4 и В) SNU-601 после инкубации в течение 48 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 x анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV x анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают, что биспецифические антитела усиливают уничтожение клеток-мишеней (т.е. клеток NUGC-4 и SNU-601), на что указывает увеличение количества мертвых/умирающих клеток.

На фигуре 10 показан процент CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих А) CD69, В) CD25 и С) CD107a после инкубации клеток NUGC-4 в течение 48 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 x анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV x анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают тенденцию, соответствующую RTCC, т.е., например, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентное связывание CLDN18.2 усиливает активацию и дегрануляцию Т-клеток.

На фигуре 11 показан процент CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих А) CD69, В) CD25 и С) CD107a после инкубации клеток NUGC-4 в течение 48 часов с человеческими МКПК (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 x анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV x анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают тенденцию, соответствующую RTCC, т.е., например, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентное связывание CLDN18.2 усиливает активацию и дегрануляцию Т-клеток.

На фигуре 12 показан процент CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих А) CD69, В) CD25 и С) CD107a после инкубации клеток SNU-601 в течение 48 часов с человеческими МКПК (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 х анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают тенденцию, соответствующую RTCC, т.е., например, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентное связывание CLDN18.2 усиливает активацию и дегрануляцию Т-клеток.

На фигуре 13 показан процент CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих А) CD69, В) CD25 и С) CD107a после инкубации клеток SNU-601 в течение 48 часов с человеческими МКПК (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и анти-CLDN18.2 х анти-CD3 биспецифическими антителами, содержащими мышиный CLDN18.2 АСД. Контроли включали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело, только клетки-мишени и только клетки-мишени и эффекторные клетки. Данные показывают тенденцию, соответствующую RTCC, т.е., например, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентное связывание CLDN18.2 усиливает активацию и дегрануляцию Т-клеток.

На фигуре 14 показаны уровни экспрессии на А) клетках SNU-601 и В) клетках SNU-601(2E4) (обогащенной популяцией, экспрессирующей CLDN18.2), определенные с помощью проточной цитометрии. Данные показывают, что SNU-601(2E4) содержит существенно более высокую популяцию CLDN18.2⁺ клеток. Эксперименты в этом разделе проводили с использованием клеток SNU-601(2E4).

На фигуре 15 показано связывание биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител, содержащих гуманизированный CLDN18.2 АСД, с клетками SNU-601(2E4). В качестве контроля использовали XENP24644 (H0L0 CLDN18.2; двухвалентное мАт), XENP29470 (H1L1 CLDN18.2; двухвалентное мАт), XENP29471 (H2L1 CLDN18.2; двухвалентное мАт), XENP24645 (Fab-scFv), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичные антитела. Данные показывают, что биспецифические антитела, содержащие гуманизированные CLDN18.2 АСД, имели такое же связывание с клетками SNU-601(2E4), что и биспецифические антитела, содержащие мышинные CLDN18.2 АСД, что указывает на то, что гуманизация сохранила эффективность связывания антител. Примечательно, что биспецифические антитела в формате «Fab2-scFv» продемонстрировали сходное связывание с бивалентными анти-CLDN18.2 мАт. Кроме того, данные показывают, что биспецифические антитела на основе гуманизированного

варианта H1L1 (например, XENP29472, XENP29474, XENP29476 и XENP29478) лучше сохраняют связывание, чем биспецифические антитела на основе гуманизированного варианта H2L1 (например, XENP29473, XENP29475, XENP29477 и XENP29479).

На фигуре 16 изображена индукция RTCC в клетках SNU-601(2E4) А) на что указывает уменьшение количества CFSE+ SNU-601(2E4), В) на что указывает процентное содержание клеток CFSE+ SNU-601(2E4), окрашенных Zombie Aqua. и С), на что указывает средняя интенсивность флуоресценции (MFI) Zombie Aqua на клетках CFSE+ SNU-601(2E4) после инкубации меченого CFSE SNU-601(2E4) в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД к клеткам SNU-601(2E4). В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичное антитело. В соответствии с данными связывания, гуманизация сохранила индукцию RTCC с помощью бсАт, имеющих гуманизированные CLDN18.2 АСД.

На фигуре 17 изображена активация CD4+ Т-клеток, как показано А) CD69 MFI на CD4+ Т-клетках и В) процентом CD4+ Т-клеток, экспрессирующих CD69, после инкубации SNU-601(2E4) в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффектора к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД. В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv-Fc), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичное антитело. В соответствии с данными связывания, гуманизация сохраняла активацию Т-клеток с помощью бсАт, имеющих гуманизированные CLDN18.2 АСД.

На фигуре 18 изображена дегрануляция CD4+ Т-клеток, на что указывает А) CD107a MFI на CD4+ Т-клетках и В) процент CD4+ Т-клеток, экспрессирующих CD107a, после инкубации SNU-601(2E4) в течение 24 часов с человеческими МКПК (соотношение эффектора к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД. В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv-Fc), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичное антитело.

На фигуре 19 изображена активация CD8+ Т-клеток, как показано А) CD69 MFI на CD8+ Т-клетках и В) процентом CD8+ Т-клеток, экспрессирующих CD69, после инкубации SNU-601(2E4) в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффектора к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД. В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv-Fc), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичное

антитело. В соответствии с данными связывания, гуманизация сохраняла активацию Т-клеток с помощью бсАт, имеющих гуманизированные CLDN18.2 АСД.

На фигуре 20 изображена дегрануляция CD8⁺ Т-клеток, на что указывает А) CD107a MFI на CD8⁺ Т-клетках и В) процент CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих CD107a, после инкубации SNU-601(2E4) в течение 24 часов с человеческими МКПК (соотношение эффектора к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД. В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv-Fc), XENP24647 (Fab2-scFv), только клетки и только вторичное антитело.

На фигуре 21 изображены А) IFN γ и В) секреция TNF α Т-клетками после инкубации SNU-601(2E4) в течение 24 часов с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1) и биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами, содержащими гуманизированный CLDN18.2 АСД. В качестве контроля использовали XENP24645 (Fab-scFv-Fc) и XENP24647 (Fab2-scFv). В соответствии с данными связывания, гуманизация сохраняла индукцию секреции цитокинов бсАт, имеющими гуманизированные CLDN18.2 АСД.

На фигуре 22 показано связывание биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител, содержащих мышиный и гуманизированный (вариант H1L1) CLDN18.2 АСД, с клетками HEK293, транзитивно трансфицированными для экспрессии CLDN18.2 А) человека, В) яванского макака и С) мыши. Данные показывают, что биспецифические анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антитела дозозависимо связывались с клетками, трансфицированными каждым из CLDN18.2 человека, яванского макака и мыши. Примечательно, что биспецифические антитела формата «Fab2-scFv» (т.е. XENP24647 и XENP29476) связывались с клетками, трансфицированными CLDN18.2, по сравнению с биспецифическими антителами формата «Fab-scFv» (т.е. XENP24645 и XENP29472), гораздо более эффективно, а также с силой, аналогичной силе связывания бивалентного формата моноклональных антител (т.е. XENP24644).

На фигуре 23 изображены EC50 для связывания биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител, содержащих мышиный и гуманизированный (вариант H1L1) CLDN18.2 АСД, с клетками HEK293, временно трансфицированными для экспрессии CLDN18.2 человека, яванского макака и мыши.

На фигуре 24 показано связывание биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител, содержащих мышиный и гуманизированный (вариант H1L1) CLDN18.2 АСД, с клетками HEK293, временно трансфицированными для экспрессии А) CLDN18.1 человека, В) CLDN18.1 яванского макака, С) CLDN18.1 мыши и D) CLDN9 человека.

Данные показывают, что ни одно из биспецифических анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антител не продемонстрировало нецелевого связывания.

На фигуре 25 изображена индукция RTCC на клетках NUGC-4 с помощью биспецифических антител и сравнительного биспецифического антитела анти-CLDN18.2 х анти-CD3 (AMG 910) с использованием МКПК от А) первого и В) второго донора. Данные показывают, что XENP32461 индуцировал RTCC с такой же эффективностью, как и биспецифическое антитело сравнения, а XENP31726 индуцировал RTCC с повышенной эффективностью по сравнению с биспецифическим антителом сравнения.

На фигуре 26 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD4 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами в присутствии клеток ВхРС3 (имеющих 600 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 10:1.

На фигуре 27 изображена индукция А) $IFN\gamma$, В) $TNF\alpha$ и С) секреции IL2 биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами в присутствии клеток ВхРС3 (имеющих 600 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток в соотношении Э:Т 10:1.

На фигуре 28 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD4 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами в присутствии клеток GSU (имеющих 70 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 10:1.

На фигуре 29 изображена индукция А) $IFN\gamma$, В) $TNF\alpha$ и С) секреции IL2 биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами в присутствии клеток GSU (имеющих 70 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток в соотношении Э:Т 10:1.

На фигуре 30 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD4 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) биспецифическими анти-CLDN18.2 х анти-CD3 антителами в присутствии клеток NUGC4 (имеющих 50 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 10:1.

На фигуре 31 изображена индукция А) секреции $IFN\gamma$, В) $TNF\alpha$ и С) IL2 биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток NUGC4 (имеющих 50 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток в соотношении Э:Т 10:1.

На фигуре 32 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD4 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток KatoIII (имеющих 30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 10:1.

На фигуре 33 показана индукция А) секреции $TNF\alpha$ и В) IL2 биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток KatoIII (имеющих 30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 10:1.

На фигуре 34 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция секреции $TNF\alpha$ биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток KatoIII (имеющих 30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 3:1.

На фигуре 35 изображены А) индукция RTCC, В) индукция активации CD4 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) и С) индукция активации CD8 Т-клеток (на что указывает процент клеток, экспрессирующих CD107a) биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток HGC27 (имеющих 20 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 3:1.

На фигуре 36 изображена индукция А) $IFN\gamma$, В) $TNF\alpha$ и С) секреции IL2 биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток HGC27 (имеющих 20 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 3:1.

На фигуре 37 изображены А) индукция RTCC и В) индукция секреции $TNF\alpha$ биспецифическими анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антителами в присутствии клеток KatoIII (имеющих 30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и эффекторных клеток при соотношении Э:М 1:1.

На фигуре 38 показано изменение объема опухоли и изменение массы тела у мышей NOG с трансплантированными МКПК человека, несущими опухоль NUGC-4 10cF7_5_3E10, которым вводили ASP2138 (XENP31726). МКПК человека вводили

внутривенно по 5×10^6 клеток. Через неделю после инъекции МКПК человека клетки NUGC-4 10сF7_5_3E10 подкожно инокулировали в бок мышей в количестве 1×10^6 клеток на -8 день. Мышам NOG внутрибрюшинно вводили ФСБ или ASP2138 один раз в неделю в день 0 и день 7. А) объемы опухолей и В) массы тела каждой группы были нанесены на график в каждый момент времени как среднее $\pm$ SEM ($n = 10$). С) диаграммы рассеяния показывают индивидуальный объем опухоли на 14 день, а среднее значение $\pm$ SEM выражается в виде коротких горизонтальных линий и полос ошибок. Статистический анализ проводился по значениям на 14 день. ns: незначительно, **: $p < 0,01$ по сравнению со значением группы, получавшей ФСБ, (критерий множественного сравнения Даннетта).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя настоящее изобретение будет описано подробно ниже, следует принять к сведению, что это изобретение не ограничивается описанными в данной заявке конкретными методологией, протоколами и реактивами, поскольку они могут меняться. Также следует принять к сведению, что использованная в данной заявке терминология необходима только для целей описания конкретных воплощений, и не предназначена для ограничения рамок настоящего изобретения, которые будут ограничены только прилагаемой формулой изобретения. Если иное не определено, все технические и научные термины, использованные в данной заявке, имеют те же смыслы, которые вкладываются в них обычным специалистом в данной области.

Далее будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены с конкретными воплощениями, однако следует понимать, что они могут объединяться любым способом и в любом количестве с созданием дополнительных воплощений. По-разному описанные примеры и предпочтительные воплощения не следует рассматривать как ограничения настоящего изобретения, они предназначены исключительно для ясного описания воплощений. Следует понимать, что описание поддерживает и охватывает воплощения, которые объединяют ясно описанные воплощения с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных воплощений. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в данной заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки до тех пор, пока из контекста не следует иное.

Предпочтительно, чтобы используемые в данной заявке термины были определены, как описано в «A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)», H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland, (1995).

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут использованы, если не указано иное, обычные способы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и способы рекомбинантной ДНК, которые объясняются в литературе в данной области (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

В этом описании и в последующей формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово «включать» и его варианты, такие как «включает» и «включающий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного члена, целого числа, стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого члена, целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий, хотя в некоторых воплощениях такой другой член, целое число или стадия или группа членов, целых чисел или стадий могут быть исключены, то есть объект изобретения заключается во включении указанного члена, целого числа или стадии или группы членов, целых чисел или стадий. Однако в качестве конкретного воплощения настоящего раскрытия предполагается, что термин «включающий» охватывает возможность отсутствия дополнительных членов, т.е. для целей этого воплощения термин «включающий» следует понимать как имеющий значение «состоящий из» или «состоящий по существу из».

Подразумевается, что термины «a» и «an», и «the» (прим.: в исходном тексте на английском языке) и подобные, используемые в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) охватывают как форму единственного числа, так и множественного, до тех пор, пока в данной заявке не указано иное или очевидно не противоречит контексту. Перечисление интервалов в данной заявке предназначено всего лишь для того, чтобы служить в качестве способа сокращения для индивидуального обозначения каждого отдельного значения, попадающего в интервал. До тех пор, пока в данной заявке не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально перечислено в данной заявке. Все способы, описанные в данной заявке, могут осуществляться в любом подходящем порядке до тех пор, пока в данной заявке не указано иное или иное очевидно не следует из контекста. Использование любого из и всех примеров, или типичного выражения (например, «такой как»), представленное в данной заявке, предназначено всего лишь для лучшей иллюстрации изобретения и не обладает ограничением рамок изобретения, заявленных иным способом. Никакое выражение в описании не должно рассматриваться в качестве обозначения любого не заявленного элемента, существенного для практического применения изобретения.

Термин «около» означает приблизительно или почти, а в контексте числового значения или диапазона, изложенного в данной заявке в одном воплощении, означает $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 3\%$ от числового значения или диапазона, изложенного или заявленного.

Несколько документов цитируется по всему тексту данного описания. Каждый из документов, процитированных в данной заявке (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, описании производителя, инструкции и т.д.), будь то выше или ниже, настоящим полностью включен ссылкой. Ничто не должно быть истолковано как допущение того, что изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию на основании предшествующего изобретения.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим связывающим агентам, где связывающие агенты связывают свои молекулы-мишени либо моновалентно через один антигенсвязывающий домен, либо бивалентно через два антигенсвязывающих домена, каждый из которых независимо связывается с антигеном.

Первой целевой молекулой описанных в данной заявке связывающих агентов является CLDN18.2.

Клаудины представляют собой семейство белков, которые являются наиболее важными компонентами плотных контактов, где они создают парацеллюлярный барьер, контролирующий поток молекул в межклеточном пространстве между клетками эпителия. Клаудины представляют собой трансмембранные белки, охватывающие мембрану 4 раза, причем N-концевой и C-концевой конца расположены в цитоплазме. Первая внеклеточная петля, называемая EC1 или ECL1, состоит в среднем из 53 аминокислот, а вторая внеклеточная петля, называемая EC2 или ECL2, состоит примерно из 24 аминокислот. Белки клеточной поверхности семейства клаудинов, такие как CLDN18.2, экспрессируются в опухолях различного происхождения и особенно подходят в качестве структур-мишеней в связи с иммунотерапией рака, опосредованной антителами, благодаря их селективной экспрессии (отсутствие экспрессии в нормальной ткани, имеющей отношение к токсичному воздействию) и локализацией на плазматической мембране.

Было показано, что CLDN18.2 дифференциально экспрессируется в опухолевых тканях, причем единственными нормальными тканями, экспрессирующими CLDN18.2, являются ткани желудка. CLDN18.2 избирательно экспрессируется в нормальных тканях в дифференцированных эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка. CLDN18.2 экспрессируется при раке различного происхождения, таком как рак поджелудочной железы, рак пищевода, рак желудка, бронхиальный рак, рак молочной железы и опухоли

ЛОР-органов. CLDN18.2 является ценной мишенью для профилактики и/или лечения первичных опухолей, таких как рак желудка, рак пищевода, рак гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рак поджелудочной железы, рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак яичников, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак печени, рак головы-шеи и рак желчного пузыря и их метастазы, в частности метастазы рака желудка, такие как опухоли Крукенберга, метастазы в брюшину и метастазы в лимфатические узлы. Термин «клаудин 18» или «CLDN18» относится к клаудину 18 и включает любые варианты, включая вариант 1 сплайсинга клаудина 18 (клаудин 18.1 (CLDN18.1)) и вариант 2 сплайсинга клаудина 18 (клаудин 18.2 (CLDN18.2)).

Термин «CLDN18.2» предпочтительно относится к CLDN18.2 человека и, в частности, к белку, содержащему, предпочтительно состоящему из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 списка последовательностей или варианту указанной аминокислотной последовательности. Первая внеклеточная петля CLDN18.2 предпочтительно содержит аминокислоты 27 - 81, более предпочтительно аминокислоты 29 - 78 аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1. Вторая внеклеточная петля CLDN18.2 предпочтительно содержит аминокислоты 140 - 180 или 144 - 167 аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1. Указанные первая и вторая внеклеточные петли предпочтительно образуют внеклеточную часть CLDN18.2.

Второй молекулой-мишенью описанных в данной заявке связывающих агентов является CD3 (кластер дифференцировки 3). Комплекс CD3 обозначает антиген, который экспрессируется на зрелых Т-клетках человека, тимоцитах и подмножестве естественных клеток-киллеров как часть комплекса мультимолекулярного рецептора Т-клеток (TCR). Корцептор Т-клеток представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Эти цепи связываются с молекулой, известной как рецептор Т-клеток (TCR), и ζ -цепью, генерируя сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR, ζ -цепи и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

CD3 ϵ человека представлен в учетном номере GenBank HM_000733. CD3 γ человека представлен в учетном номере GenBank HM_000073. CD3 δ человека представлен в учетном номере GenBank HM_000732. CD3 отвечает за передачу сигнала TCR. Как описано Lin и Weiss, Journal of Cell Science 114, 243-244 (2001), активация комплекса TCR путем связывания МНС-представленных специфических антигенных эпитопов приводит к фосфорилированию тирозиновых мотивов активации

иммунорецепторов (ITAM) с помощью киназ семейства Src, запуская рекрутирование дополнительных киназ, что приводит к активации Т-клеток, включая высвобождение Ca^{2+} . Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, иммобилизованными анти-CD3-антителами приводит к активации Т-клеток, аналогичному вовлечению рецептора Т-клеток, но независимо от типичной специфичности его клона.

Используемый в данной заявке термин «CD3» включает CD3 человека и обозначает антиген, который экспрессируется на Т-клетках человека как часть мультимолекулярного рецепторного комплекса Т-клеток. Что касается CD3, связывающий агент по изобретению предпочтительно распознает эпсилон-цепь CD3. В некоторых воплощениях он распознает эпитоп, который соответствует первым 27 N-концевым аминокислотам эпсилона CD3 или функциональным фрагментам этого участка из 27 аминокислот.

Термин «вариант» по изобретению относится, в частности, к мутантам, сплайс-вариантам, конформациям, изоформам, аллельным вариантам, видовым вариантам и видовым гомологам, в частности тем, которые присутствуют в природе. Аллельный вариант относится к изменению нормальной последовательности гена, значение которого часто неясно. Полное секвенирование генов часто идентифицирует многочисленные аллельные варианты данного гена. Гомолог вида представляет собой нуклеотидную или аминокислотную последовательность, происхождение которой отличается от вида данной нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Термин «вариант» должен охватывать любые посттрансляционно модифицированные варианты и варианты конформации.

Согласно изобретению термин «CLDN18.2-положительная злокачественная опухоль» или подобные термины означают злокачественную опухоль, включающую клетки злокачественной опухоли, экспрессирующие CLDN18.2, предпочтительно на поверхности указанных клеток злокачественной опухоли.

Термин «клеточная поверхность» используется в соответствии с его обычным значением в данной области техники и, таким образом, включает внешнюю часть клетки, доступную для связывания белками и другими молекулами.

CLDN18.2 экспрессируется на поверхности клеток, если он расположен на поверхности указанных клеток и доступен для связывания с добавленными к клеткам CLDN18.2-специфичными антителами.

CD3 экспрессируется на поверхности клеток, если он расположен на поверхности указанных клеток и доступен для связывания CD3-специфичными антителами, добавленными к клеткам.

Термин «внеклеточная часть» в контексте настоящего изобретения относится к части молекулы, такой как белок, которая обращена к внеклеточному пространству клетки и предпочтительно доступна снаружи указанной клетки, например, антиген-связывающим молекулам, таким как антитела, расположенные вне клетки. Предпочтительно термин относится к одной или нескольким внеклеточным петлям или доменам или их фрагментам.

Термины «часть» или «фрагмент» используются в данной заявке взаимозаменяемо и относятся к непрерывному элементу. Например, часть структуры, такой как аминокислотная последовательность или белок, относится к непрерывному элементу указанной структуры. Участок, часть или фрагмент структуры предпочтительно включает одно или несколько функциональных свойств указанной структуры. Например, участок, часть или фрагмент эпитопа или пептида предпочтительно иммунологически эквивалентны эпитопу или пептиду, из которого он получен. Часть или фрагмент аминокислотной последовательности предпочтительно содержит последовательность из по меньшей мере 4, в частности, по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 50 или не менее 100 последовательных аминокислот белковой последовательности.

«Фрагмент» при отсылки на аминокислотную последовательность (пептид или белок) относится к части аминокислотной последовательности, то есть, последовательности, которая представляет аминокислотную последовательность, укороченную на N-конце и/или C-конце. Фрагмент, укороченный на C-конце (N-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 3'-конец открытой рамки считывания. Фрагмент, укороченный на N-конце (C-концевой фрагмент), можно получить, например, путем трансляции укороченной открытой рамки считывания, в которой отсутствует 5'-конец открытой рамки считывания, до тех пор, пока укороченная открытая рамка считывания содержит стартовый кодон, который служит для инициации трансляции. Фрагмент аминокислотной последовательности включает, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности.

Под «вариантом» аминокислотной последовательности или подобными выражениями в данной заявке подразумевается аминокислотная последовательность, которая отличается от родительской аминокислотной последовательности посредством по меньшей мере одной аминокислотной модификации. Исходная аминокислотная последовательность может быть аминокислотной последовательностью природного или

дикого типа (WT) или может быть модифицированной версией аминокислотной последовательности дикого типа. Предпочтительно вариантная аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью, например, от 1 до около 20 аминокислотных модификаций, и предпочтительно от 1 до около 10 или от 1 до около 5 аминокислотных модификаций по сравнению с исходной.

Под «диким типом», или «WT», или «нативной», используемым в отношении аминокислотной последовательности, в данной заявке подразумевают аминокислотную последовательность, которая встречается в природе, включая аллельные вариации. Аминокислотная последовательность дикого типа, пептид или белок имеет аминокислотную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

Для целей настоящего изобретения «варианты» аминокислотной последовательности (пептид, белок или полипептид) включают варианты с вставкой аминокислот, варианты с добавлением аминокислот, варианты с делецией аминокислот и/или варианты с заменой аминокислот. Термин «вариант» включает все мутанты, варианты сплайсинга, варианты, модифицированные после трансляции, конформации, изоформы, аллельные варианты, видовые варианты и видовые гомологи, в частности те, которые встречаются в природе. Термин «вариант» включает, в частности, фрагменты аминокислотной последовательности.

Аминокислотные варианты со вставкой включают вставки одной или двух или более аминокислот в конкретную аминокислотную последовательность. В случае вариантов аминокислотной последовательности, имеющих вставку, один или несколько аминокислотных остатков вставляются в конкретный сайт в аминокислотной последовательности, хотя также возможна случайная вставка с соответствующим скринингом полученного продукта.

Варианты присоединения аминокислот включают слияния на амино- и/или карбокси-конце одной или нескольких аминокислот, например, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или большего количества аминокислот.

Варианты с делецией аминокислот характеризуются удалением одной или нескольких аминокислот из последовательности, например, удалением 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 или большего количества аминокислот. Делеции могут находиться в любом положении белка. Варианты с делецией аминокислот, которые содержат делецию на N-конце и/или C-конце белка, также называются вариантами с укорочением на N-конце и/или C-конце.

Аминокислотные варианты с заменой характеризуются тем, что, по меньшей мере, один остаток в последовательности удаляется, а другой остаток вставляется на его место.

Предпочтение отдается модификациям в положениях в аминокислотной последовательности, которые не являются консервативными между гомологичными белками или пептидами, и/или замене аминокислот другими, имеющими аналогичные свойства. Предпочтительно, аминокислотные изменения в пептидных и белковых вариантах представляют собой консервативные аминокислотные изменения, то есть замены одинаково заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативная замена аминокислот включает замену одной из семейства аминокислот, которые похожи в своих боковых цепях. Природные аминокислоты обычно делятся на четыре семейства: кислые (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты.

В контексте настоящего изобретения, консервативные замены могут определяться с помощью замен внутри классов аминокислот, отраженных в следующей таблице:

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R), и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y), и Trp (W)

Предпочтительно степень сходства, предпочтительно идентичности между данной аминокислотной последовательностью и аминокислотной последовательностью, которая является вариантом указанной данной аминокислотной последовательности, будет составлять по меньшей мере около 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%. Степень сходства или идентичности дается предпочтительно для аминокислотной области, которая составляет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере, около 70%, по меньшей мере, около 80%, по меньшей мере, около 90% или около 100% всей длины референсной аминокислотной последовательности. Например, если референсная аминокислотная последовательность состоит из 200 аминокислот, степень сходства или идентичности указывается предпочтительно для по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 100 по меньшей мере

около 120, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 180 или около 200 аминокислот, в некоторых воплощениях непрерывных аминокислот. В некоторых воплощениях степень сходства или идентичности указана для всей длины референсной аминокислотной последовательности. Выравнивание для определения сходства последовательностей, предпочтительно идентичности последовательностей, может быть выполнено с помощью известных в данной области инструментов, предпочтительно с использованием наилучшего выравнивания последовательностей, например, с помощью Align, с использованием стандартных настроек, предпочтительно EMBOSS :: Needle, Matrix: Blosum62, штраф за открытие разрыва 10,0, штраф за продолжение разрыва 0,5.

«Сходство последовательностей» означает процент аминокислот, которые либо идентичны, либо представляют собой консервативные аминокислотные замены. «Идентичность последовательностей» между двумя аминокислотными последовательностями означает процент аминокислот, которые идентичны между последовательностями. «Идентичность последовательностей» между двумя последовательностями нуклеиновых кислот означает процент нуклеотидов, которые идентичны между последовательностями.

Термины «идентичный на %», «% идентичности» или аналогичные термины предназначены для обозначения, в частности, процента нуклеотидов или аминокислот, которые идентичны при оптимальном выравнивании между сравниваемыми последовательностями. Указанный процент является чисто статистическим, и различия между двумя последовательностями могут быть, но не обязательно, случайным образом распределены по всей длине сравниваемых последовательностей. Сравнение двух последовательностей обычно проводят путем сравнения последовательностей после оптимального выравнивания относительно сегмента или «окна сравнения», чтобы идентифицировать локальные области соответствующих последовательностей. Оптимальное выравнивание для сравнения может быть выполнено вручную или с помощью алгоритма локальной гомологии Smith and Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, с помощью алгоритма локальной гомологии Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, с помощью алгоритма поиска подобия Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444 или с помощью компьютерных программ, использующих указанные алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин). В некоторых воплощениях процент идентичности двух последовательностей определяется с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP,

доступного на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (например, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). В некоторых воплощениях параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTN на веб-сайте NCBI, включают: (i) ожидаемое пороговое значение, равное 10; (ii) размер слова равен 28; (iii) максимальное количество совпадений в диапазоне запроса, равно 0; (iv) показатели соответствия/несоответствия равны 1, -2; (v) цена разрыва установлена на Linear; и (vi) для областей низкой сложности используется фильтр. В некоторых воплощениях параметры алгоритма, используемые для алгоритма BLASTP на веб-сайте NCBI, включают: (i) ожидаемое пороговое значение, равное 10; (ii) Размер слова, установленный на 3; (iii) максимальное количество совпадений в диапазоне запроса, равно 0; (iv) матрица BLOSUM62; (v) цена разрыва установлена на Наличие: 11 Удлинение: 1; и (vi) корректировка условной композиционной матрицы баллов.

Идентичность в процентах получается путем определения количества идентичных положений, которым соответствуют сравниваемые последовательности, деления этого числа на количество сравниваемых положений (например, количества положений в референсной последовательности) и умножения этого результата на 100.

В некоторых воплощениях указана степень сходства или идентичности для области, которая составляет по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% по всей длине референсной последовательности. Например, если референсная последовательность нуклеиновой кислоты состоит из 200 нуклеотидов, степень идентичности указана для по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 120, по меньшей мере около 140, по меньшей мере около 160, по меньшей мере около 180 или примерно 200 нуклеотидов, в некоторых воплощениях непрерывных нуклеотидов. В некоторых воплощениях степень сходства или идентичности указана для всей длины референсной последовательности.

Гомологичные аминокислотные последовательности демонстрируют в соответствии с раскрытием по меньшей мере 40%, в частности по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и предпочтительно по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотных остатков.

Описанные в данной заявке варианты аминокислотной последовательности могут быть легко получены специалистом, например, путем манипуляций с рекомбинантной ДНК. Манипуляции с последовательностями ДНК для получения пептидов или белков,

содержащих замены, добавления, вставки или делеции, подробно описаны, например, в Sambrook et al. (1989). Кроме того, описанные в данной заявке пептиды и варианты аминокислот могут быть легко получены с помощью известных методов синтеза пептидов, таких как, например, твердофазный синтез и аналогичные способы.

В одном воплощении фрагмент или вариант аминокислотной последовательности (пептид или белок) предпочтительно представляет собой «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант». Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант» аминокислотной последовательности относится к любому фрагменту или варианту, проявляющему одно или несколько функциональных свойств, идентичных или аналогичных свойствам аминокислотной последовательности, из которой он получен, т.е. он функционально эквивалентен. Что касается антигенсвязывающих доменов, содержащих функциональные варианты VH и VL, одной конкретной функцией является сохранение связывания указанного связывающего домена. Термин «функциональный фрагмент» или «функциональный вариант», используемый в настоящей заявке, в частности, относится к варианту молекулы или последовательности, которая включает аминокислотную последовательность, измененную одной или несколькими аминокислотами по сравнению с аминокислотной последовательностью исходной молекулы или последовательности, и которая все еще способна выполнять одну или несколько или все функции исходной молекулы или последовательности, например, образовывать связывающий домен со специфичностью к конкретному антигену. Например, связывающий домен, содержащий функциональные варианты VH и VL или последовательности функционального варианта CDR, имеет такие же или подобные характеристики связывания по сравнению с исходной молекулой. В одном воплощении модификации в аминокислотной последовательности исходной молекулы или последовательности существенно не влияют на и не изменяют характеристики молекулы или последовательности. В различных воплощениях характеристики молекулы, содержащей функциональный фрагмент или функциональный вариант, например, характеристики связывания, такие как сила связывания домена связывания, могут быть снижены, но все же в значительной степени присутствовать, например, характеристики связывания, такие как сила связывания домена связывания, содержащего функциональный вариант, могут составлять по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% исходной молекулы или последовательности. Например, функциональный вариант может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных вставок, добавлений аминокислот, замен аминокислот и/или делеций аминокислот по сравнению с исходной молекулой. Однако в

других воплощениях характеристики молекулы, содержащей функциональный вариант или функциональный фрагмент, например, характеристики связывания связывающего домена, содержащего функциональный фрагмент или функциональный вариант, могут быть улучшены по сравнению с исходной молекулой. В некоторых воплощениях «функциональный вариант» представляет собой «функциональный фрагмент», например, аминокислотную последовательность, которая укорочена на N-концевом и/или C-концевом конце по сравнению с исходной молекулой, но сохраняет или сохраняет по существу один или более или все функции исходной молекулы, как описано выше, и, в частности, функционально эквивалентны исходной молекуле.

Термин «функциональный вариант» аминокислотной последовательности включает «функциональные» фрагменты указанной аминокислотной последовательности.

Характеристики функциональных вариантов, например, характеристики связывания, можно анализировать известными способами, например, с использованием ELISA-анализа, как описано в настоящей заявке, для связывающих агентов, конкурирующих друг с другом.

Аминокислотная последовательность (пептид, белок или полипептид, например, VH, VL, CH1, CH2 или CH3), «происходящая из» обозначенной аминокислотной последовательности (пептида, белка или полипептида, например, VH, VL, CH1, CH2 или CH3) относится к происхождению первой аминокислотной последовательности. Предпочтительно аминокислотная последовательность, происходящая из конкретной аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая идентична, по существу идентична или гомологична этой конкретной последовательности или ее фрагменту. Аминокислотные последовательности, полученные из конкретной аминокислотной последовательности, могут быть вариантами этой конкретной последовательности или ее фрагмента, предпочтительно ее функциональными вариантами, как описано в настоящей заявке, включая функциональные фрагменты. Например, специалисту в данной области техники будет понятно, что аминокислотные последовательности, подходящие для применения в данной заявке, могут быть изменены таким образом, что они различаются по последовательности, включая вставки аминокислот, делеции аминокислот, добавления аминокислот и/или замены аминокислот из встречающихся в природе или нативных последовательностей, из которых они были получены, сохраняя при этом или по существу сохраняя искомую активность нативных последовательностей. Например, аминокислотные последовательности доменов VH, VL, CH1, CH2 и/или CH3 в пептидных цепях связывающего агента по изобретению происходят из аминокислотных последовательностей доменов VH, VL, CH1, CH2 и/или

СНЗ иммуноглобулинов, но могут быть изменены по сравнению с доменами, из которых они получены. Например, по изобретению VH или VL, полученные из иммуноглобулина, содержат аминокислотную последовательность, которая может быть идентична аминокислотной последовательности соответствующего VH или VL, из которого они получены, или может отличаться одной или несколькими аминокислотными положениями по сравнению с последовательностью соответствующего исходного VH или VL. Например, домен VH связывающего агента по изобретению может содержать аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько вставок аминокислот, добавлений аминокислот, делеций аминокислот и/или замен аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью домена VH, из которого этот домен получен. Например, домен VL связывающего агента по изобретению может содержать аминокислотную последовательность, содержащую одну или несколько вставок аминокислот, добавлений аминокислот, делеций аминокислот и/или замен аминокислот по сравнению с аминокислотной последовательностью домена VL, из которого этот домен получен. Предпочтительно, VH или VL, имеющие аминокислотную последовательность, которая является функциональным вариантом аминокислотной последовательности родительских VH или VL, обеспечивают те же или по существу те же функции, что и аминокислотная последовательность родительских VH или VL, например, по показателю специфичности связывания, силы связывания и т.д. Однако, как известно среднему специалисту в данной области техники, в некоторых воплощениях также может быть предпочтительным получить функциональный вариант аминокислотной последовательности, например, VH или VL, который имеет измененные характеристики по сравнению с аминокислотной последовательностью исходной молекулы. Те же соображения применимы к аминокислотным последовательностям, например, CDR, и к другим аминокислотным последовательностям, например, к последовательностям доменов CH1, CH2, CH3 и/или CL.

Когда описывается, что биспецифический связывающий агент содержит VH, «полученный из» иммуноглобулина, и VL, «полученный из» того же или другого иммуноглобулина, термин «полученный из» означает, что биспецифический связывающий агент был получен путем рекомбинации любым известным способом, указанных VH и VL из указанного(ых) иммуноглобулина(ов) в полученный биспецифический связывающий агент. В этом контексте «рекомбинация» не ограничивается каким-либо конкретным способом рекомбинации и, таким образом, включает все способы получения биспецифических связывающих агентов, описанные в данной заявке ниже или известные в данной области техники, включая, например,

рекомбинацию на уровне нуклеиновой кислоты и/или посредством совместной экспрессии разных молекул в одних и тех же клетках.

Термин «биспецифическое антитело» или «бсАт» относится к связывающему агенту, имеющему два разных антигенсвязывающих домена, определяемых разными аминокислотными последовательностями. В некоторых воплощениях указанные разные антигенсвязывающие домены связывают разные эпитопы одного и того же антигена. Однако в предпочтительных воплощениях указанные разные антигенсвязывающие домены связывают разные целевые антигены. Биспецифический связывающий агент может иметь любой формат, включая любой из описанных в данной заявке биспецифических форматов. Связывающий агент может связывать каждый из разных антигенов или разных эпитопов с помощью одного, двух или более связывающих доменов, т.е. связывать каждый из разных антигенов или разных эпитопов моновалентно, двухвалентно (или двухвалентно), трехвалентно, четырехвалентно и даже с валентностью более высокого порядка.

Согласно изобретению CLDN18.2 по существу не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии ниже по сравнению с экспрессией в клетках или ткани желудка. Предпочтительно уровень экспрессии составляет менее 10%, предпочтительно менее 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или 0,05% от уровня экспрессии в клетках желудка или ткани желудка или даже ниже. Предпочтительно, CLDN18.2 по существу не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в незлокачественной ткани, кроме желудка, не более чем в 2 раза, предпочтительно в 1,5 раза и предпочтительно не превышает уровень экспрессии в указанной незлокачественной ткани. Предпочтительно, CLDN18.2 по существу не экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии ниже предела обнаружения и/или если уровень экспрессии слишком низок, чтобы обеспечить связывание CLDN18.2-специфическими антителами, добавленными в клетку.

Согласно изобретению CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает уровень экспрессии в незлокачественной ткани, отличной от желудка, предпочтительно более чем в 2 раза, предпочтительно в 10 раз, в 100 раз, в 1000 раз или в 10000 раз. Предпочтительно, CLDN18.2 экспрессируется в клетке, если уровень экспрессии превышает предел обнаружения и/или если уровень экспрессии достаточно высок, чтобы обеспечить связывание CLDN18.2-специфическими антителами, добавленными к клетке. Предпочтительно экспрессируемый в клетке CLDN18.2 экспрессируется или экспонируется на поверхности указанной клетки.

Согласно изобретению термин «заболевание» относится к любому патологическому состоянию, включая рак, в частности к тем формам рака, которые описаны в данной заявке. Любая ссылка в данной заявке на рак или конкретные формы рака также включает метастазы этого рака. В предпочтительном воплощении заболевание, подлежащее лечению согласно настоящему изобретению, включает клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

«Заболевания, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2» или подобные выражения, по изобретению означают, что CLDN18.2 экспрессируется в клетках больных ткани или органа. В одном воплощении экспрессия CLDN18.2 в клетках пораженной ткани или органа повышена по сравнению с состоянием в здоровой ткани или органе. Повышение относится к повышению, по меньшей мере, на 10%, в частности, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 100%, по меньшей мере, на 200%, по меньшей мере, на 500%, по меньшей мере, на 1000%, по меньшей мере, на 10000% или даже более. В одном воплощении, экспрессия обнаружена только в больной ткани, в то время как экспрессия в здоровой ткани репрессирована. Согласно изобретению заболевания, связанные с клетками, экспрессирующими CLDN18.2, включают онкологические заболевания. Согласно изобретению злокачественные опухоли предпочтительно представляют собой заболевания, при которых клетки злокачественной опухоли экспрессируют CLDN18.2.

Используемый в данной заявке термин «онкологическое заболевание» или «рак» включает заболевание, характеризующееся аномально регулируемым клеточным ростом, пролиферацией, дифференцировкой, адгезией и/или миграцией. Под «раковой клеткой» подразумевают аномальную клетку, которая растет за счет быстрой, неконтролируемой клеточной пролиферации и продолжает расти после прекращения действия стимулов, инициировавших новый рост. Предпочтительно «онкологическое заболевание» характеризуется клетками, экспрессирующими CLDN18.2, и раковыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2. Клетка, экспрессирующая CLDN18.2, предпочтительно представляет собой раковую клетку, предпочтительно рака, описанного в настоящей заявке.

Термин «рак» по изобретению включает лейкозы, саркомы, меланомы, тератомы, лимфомы, нейробластомы, глиомы, рак прямой кишки, рак эндометрия, рак почки, рак надпочечников, рак щитовидной железы, гемобластозы, рак кожи, рак головного мозга, рак шейки матки, рак кишечника, рак печени, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак желудка, рак кишечника, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак лимфатических узлов, рак пищевода, рак гастроэзофагеального

перехода (ГЭП), колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак уха, носа и горла (ЛОР), рак молочной железы, рак предстательной железы, рак матки, рак яичников и рак легкого и их метастазы. Примеры включают карциномы легкого, карциномы молочной железы, карциномы ободочной кишки, почечноклеточные карциномы, карциномы шейки матки или метастазы данных типов злокачественных опухолей или опухолей, описанных выше. Термин «рак» по изобретению также включает метастазы рака.

Согласно изобретению «карцинома» представляет собой злокачественную опухоль, возникшую из эпителиальных клеток. Данная группа характеризует наиболее распространенные злокачественные опухоли, включающие распространенные формы рака молочной железы, предстательной железы, легкого и ободочной кишки.

«Аденокарцинома» представляет собой рак, который происходит из железистой ткани. Эта ткань также является частью крупной категории тканей, известной как эпителиальная ткань. Эпителиальная ткань включает кожу, железы и множество других тканей, которые выстилают полости и органы организма. Эпителий эмбриологически происходит из эктодермы, энтодермы и мезодермы. До тех пор, пока клетки обладают секреторными свойствами, им необязательно быть частью железы, чтобы быть отнесенными к аденокарциноме клеткам. Данная форма карциномы может встречаться в некоторых высших млекопитающих, включая человека. Хорошо дифференцированные аденокарциномы имеют тенденцию к наличию сходства с тканью железы, из которой они происходят, в то время как у плохо дифференцированных такого сходства может не быть. С помощью окрашивания клеток из биопсии, патолог определит, является ли опухоль аденокарциномой или относится к некоторым другим типам злокачественных образований. Аденокарциномы могут возникать во множестве тканей организма из-за природы повсеместного присутствия желез внутри организма. В то время как каждая из желез может не секретировать одинаковые вещества, при условии, что существует экзокринная функция по отношению к клетке, предполагается, что железистая и ее злокачественная форма, таким образом, называется аденокарциномой. Злокачественные аденокарциномы проникают в другие ткани и часто метастазируют при условии наличия для этого достаточного времени. Аденокарцинома яичника представляет собой наиболее распространенный тип карциномы яичника. Она включает сывороточную и слизистую аденокарциному, светлоклеточную аденокарциному и эндометриоидную аденокарциному.

Под «метастазированием» понимают распространение клеток рака из места своего происхождения в другую часть организма. Образование метастазов представляет собой очень сложный процесс и зависит от отделения злокачественных клеток от первичной опухоли, инвазии внеклеточного матрикса, проникновения через эндотелиальную

базальную мембрану для входа в брюшную полость и в сосуды, и затем при транспортировке с помощью кровотока от инфильтрации органов-мишеней. Наконец, рост новой опухоли в сайте-мишени зависит от ангиогенеза. Опухолевое метастазирование часто происходит даже после удаления первичной опухоли, так как опухолевые клетки или компоненты могут оставаться и развивать метастатический потенциал. В одном воплощении, термин «метастазирование» по изобретению относится к «отдаленному метастазированию», которое относится к метастазированию, которое отдалено от первичной опухоли и региональной системы лимфатических узлов. В одном воплощении термин «метастазирование» по изобретению относится к метастазированию в лимфатические узлы. Одной конкретной формой метастазов, которая поддается лечению с использованием терапии или способов лечения по настоящему изобретению, является метастаз, возникающий из рака желудка в качестве первичного очага. В предпочтительных воплощениях такими метастазами рака желудка являются опухоли Крукенберга, перитонеальные метастазы и/или метастазы в лимфатические узлы.

Опухоль Крукенберга представляет собой редкую метастатическую опухоль яичника, составляющая от 1% до 2% всех опухолей яичников. Прогноз опухоли Крукенберга по-прежнему очень плохой, и не существует общепризнанного лечения опухолей Крукенберга. Опухоль Крукенберга представляет собой метастатическую перстневидно-клеточную аденокарциному яичника. Желудок является первичным источником в большинстве случаев опухоли Крукенберга (70%). Карциномы толстой кишки, аппендикса и молочной железы (в основном инвазивная дольковая карцинома) являются следующими наиболее распространенными первичными локализациями. Сообщалось о редких случаях опухоли Крукенберга, возникающей из карцином желчного пузыря, желчных путей, поджелудочной железы, тонкой кишки, фатерова сосочка, шейки матки и мочевого пузыря/урахуса.

Под «лечить» подразумевается введение соединения или композиции или комбинации соединений или композиций субъекту с целью предотвращения или устранения заболевания, включая уменьшение размера опухоли или количества опухолей у субъекта; остановить или замедлить заболевание у субъекта; ингибировать или замедлять развитие нового заболевания у субъекта; уменьшить частоту или тяжесть симптомов и/или рецидивов у субъекта, который в настоящее время страдает или ранее болел заболеванием; и/или продлевать, т.е. увеличивать продолжительность жизни субъекта.

В частности, термин «лечение заболевания» включает лечение, сокращение продолжительности, улучшение, предотвращение, замедление или ингибирование

прогрессирования или ухудшения, или предотвращение или задержку начала заболевания или его симптомов.

В контексте настоящего изобретения такие термины, как «защищать», «предотвращать», «профилактический», «предупредительный» или «защитный» относятся к предотвращению или лечению, или к тому и другому, возникновения и/или распространения заболевания у субъекта и, в частности, к минимизации вероятности того, что у субъекта разовьется заболевание, или к задержке развития заболевания. Например, человек, подверженный риску онкологического заболевания, может быть кандидатом на терапию для предотвращения онкологического заболевания.

Под «находящимся в группе риска» подразумевается субъект, у которого выявлен более высокий, чем обычно, шанс развития заболевания, в частности онкологического заболевания, по сравнению с общей популяцией. Кроме того, объект, который имел или который имеет в настоящее время заболевание, в частности рак, представляет собой объект, который имеет повышенный риск развития заболевания, как например, у объекта может продолжиться развитие заболевания. Объекты, которые в настоящее время имеют или которые имели рак, также имеют повышенный риск метастазирования злокачественного образования.

Термины «индивидуум» и «субъект» используются в данной заявке взаимозаменяемо. Они относятся к человеку или другому млекопитающему (например, мышь, крысе, кролику, собаке, кошке, корове, свинье, овце, лошади или примату), которые могут быть поражены или подвержены заболеванию или расстройству (например, онкологическому заболеванию), но могут иметь или не иметь заболевание или расстройство. Во многих воплощениях индивидуумом является человек. Если не указано иное, термины «индивидуум» и «субъект» не обозначают конкретный возраст и, таким образом, охватывают взрослых, пожилых, детей и новорожденных. В воплощениях настоящего раскрытия «индивидуум» или «субъект» является «пациентом».

Термин «пациент» означает по изобретению субъект для лечения, в частности, больной субъект, включая человека, приматов, не являющихся человеком, или других животных, в частности млекопитающих, таких как коровы, лошади, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки или грызуны, такие как мыши и крысы. В особенно предпочтительном воплощении пациентом является человек.

«Клетка-мишень» означает любую нежелательную клетку, такую как раковая клетка. В предпочтительных воплощениях клетка-мишень экспрессирует CLDN18.2.

Термин «иммунологически эквивалентный» означает, что иммунологически эквивалентная молекула, такая как иммунологически эквивалентная аминокислотная

последовательность, проявляет такие же или практически такие же иммунологические свойства и/или оказывает такие же или практически такие же иммунологические эффекты, например, в отношении типа иммунологического эффекта. В контексте настоящего раскрытия термин «иммунологически эквивалентный» предпочтительно используется в отношении иммунологических эффектов или свойств антигенов или вариантов антигенов, используемых для иммунизации. Например, аминокислотная последовательность иммунологически эквивалентна референсной аминокислотной последовательности, если указанная аминокислотная последовательность при воздействии на иммунную систему субъекта вызывает иммунную реакцию, специфичную для реакции с референсной аминокислотной последовательностью, в частности стимуляцию, прайминг и/или экспансию Т-клеток. Таким образом, молекула, которая иммунологически эквивалентна антигену, проявляет такие же или практически такие же свойства и/или оказывает такие же или практически такие же эффекты в отношении стимуляции, примирования и/или размножения Т-клеток, что и антиген, на который нацелены Т-клетки.

«Активация» или «стимуляция» при использовании в данной заявке относится к состоянию иммунной эффекторной клетки, такой как Т-клетка, которая была достаточно стимулирована, чтобы вызвать детектируемую клеточную пролиферацию. Активация также может быть связана с инициацией сигнальных путей, индуцированных продуцированием цитокинов, и детектируемых эффекторных функций. Термин «активированные иммунные эффекторные клетки» относится, среди прочего, к иммунным эффекторным клеткам, которые подвергаются клеточному делению.

Термин «примирование» относится к процессу, при котором иммунная эффекторная клетка, такая как Т-клетка, вступает в первый контакт со своим специфическим антигеном и вызывает дифференцировку в эффекторные клетки, такие как эффекторные Т-клетки.

Термин «клональное размножение» или «размножение» относится к процессу, при котором приумножается конкретный объект. В контексте настоящего изобретения термин предпочтительно используется в контексте иммунологического ответа, при котором иммунные эффекторные клетки стимулируются антигеном, пролиферируют и амплифицируется специфическая иммунная эффекторная клетка, распознающая указанный антиген. Предпочтительно клональная экспансия приводит к дифференцировке иммунных эффекторных клеток.

Термин «антиген» относится к такой молекуле, как белок или пептид, содержащей эпитоп, против которого направлен и/или должен быть направлен агент, предпочтительно для индукции иммунного ответа. Антиген или продукт его процессинга, такой как эпитоп

Т-клеток, в одном воплощении связан с рецептором Т- или В-клеток или с молекулой иммуноглобулина, такой как антитело. Соответственно, антиген или продукт его процессинга могут специфически реагировать с антителами или Т-лимфоцитами (Т-клетками). В предпочтительном воплощении антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, такой как CLDN18.2, т.е. компонент клеток рака, который может происходить из цитоплазмы, клеточной поверхности и ядра клетки, в частности те антигены, которые продуцируются, предпочтительно в большом количестве, внутриклеточно или в виде поверхностных антигенов на клетках рака.

В контексте настоящего изобретения термин «антиген, ассоциированный с опухолью» или «антиген, ассоциированный с раком» предпочтительно относится к белкам, которые в нормальных условиях специфически экспрессируются в ограниченном количестве тканей и/или органов или на определенных стадиях развития и экспрессируются или аберрантно экспрессируются в одной или нескольких тканях опухоли или рака. В контексте настоящего изобретения ассоциированный с опухолью антиген предпочтительно связан с клеточной поверхностью клетки рака и предпочтительно не экспрессируется или редко экспрессируется в нормальных тканях.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте в молекуле, например, к части молекулы, которая распознается иммунной системой, например, которая распознается антителом. Например, эпитопы представляют собой дискретные трехмерные участки на антигене, которые распознаются иммунной системой. Эпитопы как правило содержат химически активные поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи и как правило имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, прекращается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп белка предпочтительно включает непрерывную или прерывистую часть указанного белка и предпочтительно имеет длину от 5 до 100, предпочтительно от 5 до 50, более предпочтительно от 8 до 30, наиболее предпочтительно от 10 до 25 аминокислот в длину, например, длина эпитопа предпочтительно может составлять 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислот.

Термин «связывающий агент», используемый в данной заявке, относится к любому агенту, способному связываться с желаемыми антигенами. В некоторых воплощениях изобретения связывающий агент представляет собой антитело, фрагмент антитела или его конструкцию. Связывающий агент также может содержать синтетические, модифицированные или неприродные фрагменты, в частности непептидные фрагменты.

Такие фрагменты могут, например, связывать искомые антигенсвязывающие функциональные группы или области, такие как антитела или фрагменты антител. В одном воплощении связывающий агент представляет собой синтетическую конструкцию, содержащую антигенсвязывающие CDR или вариабельные области.

Термин «иммуноглобулин» относится к белкам надсемейства иммуноглобулинов, предпочтительно к антигенным рецепторам, таким как антитела или В-клеточный рецептор (BCR). Иммуноглобулины характеризуются структурным доменом, то есть доменом иммуноглобулина, имеющим характерную укладку иммуноглобулина (Ig). Термин охватывает мембраносвязанные иммуноглобулины, а также растворимые иммуноглобулины. Растворимые иммуноглобулины обычно называют антителами. Иммуноглобулины обычно содержат несколько цепей, как правило, две идентичные тяжелые цепи и две идентичные легкие цепи, которые связаны дисульфидными связями. Эти цепи в основном состоят из доменов иммуноглобулина, таких как домен VL (вариабельная легкая цепь), домен CL (константная легкая цепь), домены VH (вариабельная тяжелая цепь) и CH (константная тяжелая цепь) CH1, CH2, CH3, и CH4. Существует пять типов тяжелых цепей иммуноглобулинов млекопитающих, т.е. α , δ , ϵ , γ , и μ , которые отвечают за различные классы иммуноглобулинов, т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Классы иммуноглобулинов также называются «изотипами» (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), чтобы обозначить класс иммуноглобулинов, который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Когда конкретный изотип, например, IgG1 упоминается в настоящей заявке, этот термин не ограничивается конкретной последовательностью изотипа, например, определенной последовательностью IgG1, но используется для указания того, что антитело по последовательности ближе к этому изотипу, например, к IgG1, чем к другим изотипам. В отличие от тяжелых цепей растворимых иммуноглобулинов, тяжелые цепи мембранных или поверхностных иммуноглобулинов содержат трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен на карбокси-конце. У млекопитающих есть два типа легких цепей: лямбда и каппа. Цепи иммуноглобулина содержат вариабельную область и константную область. Константная область по существу консервативна в различных изотипах иммуноглобулинов, при этом вариабельная часть весьма разнообразна и отвечает за распознавание антигена.

Термин «антитело» относится к иммуноглобулину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Термин «антитело» включает моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, человеческие антитела,

гуманизированные антитела и химерные антитела. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи (аминокислотные остатки 118-447 IgG1 человека согласно нумерации EU), содержащей домены CH1, CH2 и CH3, где CH1 обычно соединен с CH2-CH3 пептидным линкером (также называемым «шарниром»). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно в данной заявке VL) и константной области легкой цепи (сокращенно CL). Термин «область» и термин «домен» используются в данной заявке взаимозаменяемо. Домены VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если не указано иное или не противоречит контекстом, последовательности CDR в данной заявке идентифицируются в соответствии с системой нумерации Kabat, а ссылки на положения аминокислот в константных областях в настоящем изобретении даны в соответствии с нумерацией EU (Edelman et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edit. 1991 NIH Publication No. 91-3242). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «аминокислота, соответствующая положению...», используемый в настоящей заявке, относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем сопоставления с IgG1 человека. Таким образом, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая «соответствует» аминокислоте или сегменту в другой последовательности, является аминокислотой или сегментом, который выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с использованием стандартной программы выравнивания последовательностей, такой как ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно на настройками по умолчанию и имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности тяжелой цепи IgG1 человека. В данной области техники считается хорошо известным, как выравнивать последовательность или сегмент в последовательности и тем самым определить

положение в последовательности, соответствующее положению аминокислоты согласно настоящему изобретению.

Термин «лиганд Fc IgG», используемый в данной заявке, относится к молекуле, предпочтительно полипептиду, которая связывается с областью Fc иммуноглобулина IgG с образованием комплекса Fc/Fc-лиганд. Лиганды Fc включают, без ограничения указанным, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, C1q, C3, маннан-связывающий лектин, рецептор маннозы, стафилококковый протеин А, стрептококковый протеин G и вирусный FcγR. Лиганды Fc также включают гомологи рецептора Fc (FcRH), которые представляют собой семейство рецепторов Fc, гомологичных FcγR (Davis et al., (2002) Immunol. Rev. 190:123-136). Конкретными IgG Fc-лигандами являются FcRn и Fc гамма-рецепторы. Используемый в данной заявке «лиганд Fc» может происходить из любого организма, например, мыши, человека и яванского макака.

«Гамма-рецептор Fc», «FcγR» или «FcγgammaR» относится к любому члену семейства белков, которые связывают Fc-область IgG и кодируются геном FcγR. У людей это семейство включает, без ограничения указанным, FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIb-NA1 и FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al., (2002) Immunol. Lett. 82:57-65). FcγR может происходить из любого организма, включая, без ограничения указанным, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Мышиные FcγR включают, без ограничения указанным, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2).

«FcRn» или «неонатальный Fc-рецептор», используемый в настоящей заявке, относится к белку, который связывает Fc-область IgG и кодируется, по меньшей мере частично, геном FcRn. FcRn может быть из любого организма, включая, без ограничения указанным, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Функциональный белок FcRn состоит из двух полипептидов, часто называемых тяжелой цепью (кодируемой геном FcRn) и легкой цепью (бета-2-микроглобулин). Если не указано иное, «FcRn» или «белок FcRn» относятся к комплексу тяжелой цепи FcRn с бета-2-микроглобулином. «Вариант FcRn», используемый в настоящей заявке, представляет собой вариант, который увеличивает связывание с рецептором FcRn, а также может увеличивать период полувыведения, определенный по сыворотке, .

Термин «Fc», или «область Fc», или «Fc-домен», используемый в настоящей заявке, относится к полипептиду, содержащему домены CH2 и CH3 молекулы IgG и необязательно пептидный линкер, такой как шарнир. Домены CH2-CH3 IgG1 человека

включают аминокислотные положения 231-447, а шарнир включает 216-230, согласно нумерации EU. Таким образом, что касается IgG, термин «Fc-домен», используемый в настоящей заявке, включает аминокислотные положения 231-447 (CH2-CH3) и 216-447 (шарнир-CH2-CH3) в соответствии с нумерацией EU, а также их функциональные варианты, включая их функциональные фрагменты. «Фрагмент Fc» может содержать меньшее количество аминокислот, например, N-концевой или C-концевой укороченный вариант, но все же сохраняет способность образовывать димер с другим Fc-доменом или фрагментом Fc, что можно обнаружить с помощью стандартных способов, например, в зависимости от размера (например, неденатурирующая хроматография, эксклюзионная хроматография и т.д.) и, таким образом, является функциональным вариантом. Согласно настоящему изобретению Fc-домен IgG предпочтительно представляет собой Fc-домен IgG человека, включая Fc-домен из IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

Термины «шарнир», «шарнирная область», «шарнирная область антитела» или «шарнирный домен», используемые в настоящей заявке, относятся к пептидному линкеру, содержащему аминокислоты между CH1 и CH2 иммуноглобулина, например, IgG. Структурно во встречающихся в природе молекулах IgG, например, IgG1, CH1 заканчивается в положении аминокислоты 215 согласно нумерации EU, а CH2 начинается в положении аминокислоты 231 согласно нумерации EU. Так, для IgG шарнир включает положения аминокислот с 216 по 230 согласно нумерации EU.

«Вариантный Fc-домен» содержит модификации аминокислот по сравнению с исходным Fc-доменом. Таким образом, «вариантный Fc-домен IgG1», например, вариантный Fc-домен IgG1 человека, содержит аминокислотные модификации (например, аминокислотные замены и/или делеции) в положениях, соответствующих положениям Fc-домена IgG1, например, Fc-домена IgG1 человека и предпочтительно представляет собой функциональный вариант исходного домена Fc. Такие варианты Fc-доменов IgG сохраняют по меньшей мере около 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности соответствующему исходному Fc-домену IgG человека. Необязательно варианты Fc-домены могут иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций по сравнению с исходным Fc-доменом. Необязательно варианты Fc-домены могут иметь вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных модификаций по сравнению с исходным Fc-доменом. Предпочтительно, вариантный Fc-домен сохраняет способность образовывать димер с другим Fc-доменом, что измерено с использованием методов, описанных в настоящей заявке или известных в данной области техники, таких как неденатурирующий гель-электрофорез.

Модификации Fc

Описанные в данной заявке связывающие агенты содержат по меньшей мере три различные полипептидные цепи, причем две полипептидные цепи, например, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь, содержат области CH2-CH3, предпочтительно полученные из IgG, такого как IgG1, в частности, IgG1 человека. Предпочтительно указанные первая и вторая полипептидные цепи, содержащие области CH2-CH3, способны взаимодействовать, например, димеризоваться, тем самым образуя гетеродимер, содержащий указанные первую и вторую полипептидные цепи связывающего агента, описанного в настоящей заявке. Предпочтительно, области CH2-CH3 связывающих агентов по изобретению происходят из IgG1, более предпочтительно IgG1 человека, хотя CH2 и CH3, полученные из других серотипов, можно использовать, как описано в настоящей заявке. Более того, как обсуждается в данной заявке, связывающие агенты по изобретению будут подвергаться самосборке, например, внутри продуцирующей клетки-хозяина. Например, предполагается, что CH2 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH2 на второй полипептидной цепи и/или CH3 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH3 на второй полипептидной цепи, образуя тем самым фрагмент Fc. Эти фрагменты Fc могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот или «модификаций Fc», как обсуждается в данной заявке в отношении IgG1 человека, для содействия взаимодействию между CH2 на первой и второй полипептидных цепях и/или CH3 на первой и второй полипептидных цепях, и /или обеспечить простоту очистки гетеромультимеров, таких как гетеродимеры, содержащие первую и вторую полипептидные цепи, взаимодействующие друг с другом, по сравнению с гомомультимерами, содержащими только один тип полипептидной цепи, и/или придать дополнительные полезные функциональные возможности, как обсуждается в настоящей заявке. Обсуждаемые в данной заявке модификации аминокислот также могут содержаться в доменах CH1, например, внутри первой и/или второй полипептидных цепей связывающего агента по изобретению. Кроме того, пептидные линкеры, такие как пептидные линкеры внутри фрагментов scFv или пептидные линкеры, соединяющие дополнительные домены связывающего агента, например, CH1 и scFv, или CH2 и scFv, или CH1 и CH2, могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот, как описано в настоящей заявке. Например, пептидный линкер, соединяющий область CH2-CH3 с другой областью или доменом, таким как VH(CD3), VL(CD3) или CH1, может содержать серин в аминокислотном положении, которое соответствует положению 220 согласно нумерации EU во встречающемся в природе IgG1 (где обычно можно обнаружить цистеин). Использование пептидного линкера, содержащего серин в

указанном положении, соответствующем положению 220 IgG1 человека, снижает образование дисульфида между двумя цепями, содержащими области CH2-CH3.

Таким образом, образование связывающих агентов по настоящему изобретению основано на использовании различных мономеров (например, первой и второй полипептидных цепей, описанных в настоящей заявке), содержащих аминокислотные замены, содержащие CH1, CH2 и/или CH3, такие как те, которые вносят «ассиметрию» в образование гетеродимеров, образованных указанными мономерами, по сравнению с гомодимерами, описанными в настоящей заявке, предпочтительно в сочетании с «модификациями pI», которые обеспечивают простую очистку гетеродимеров от гомодимеров, и необязательно в сочетании с «абляционными модификациями» и дополнительными модификациями Fc, обсуждаемыми в данной заявке. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любая из модификаций аминокислот, обсуждаемых в данной заявке, в отношении доменов CH1, CH2 и/или CH3 и пептидных линкеров, например, шарнирных вариантов, может быть объединена с дополнительными аминокислотными модификациями, обсуждаемыми в данной заявке или известными в данной области техники. Например, любую из ассиметричных модификаций и модификаций pI можно независимо комбинировать с абляцией и другими модификациями Fc. Модификация Fc согласно настоящему изобретению может представлять собой вставку, добавление, удаление или замену аминокислоты.

Обсуждаемые в данной заявке модификации Fc определяются в соответствии с модификациями аминокислот, которые их составляют. Например, N434S представляет собой модификацию Fc с заменой серина в положении 434 на аспарагин относительно исходного полипептида Fc IgG1 человека и в соответствии с нумерацией EU. Идентичность родительской аминокислоты может быть не установлена, и в этом случае вышеупомянутый вариант обозначается как 434S, т.е. область CH2-CH3, содержащая указанную модификацию Fc, содержит серин в положении аминокислоты, которое соответствует положению 434 в IgG1 человека в соответствии с нумерацией EU.

Модификации pI

Модификации pI увеличивают разницу изоэлектрических точек (pI) между мономерами, что позволяет проводить изоэлектрическую очистку гомо- и гетеромультимерных белков. В общем, модификация pI либо увеличивает pI полипептидной цепи (основное изменение), либо снижает pI полипептидной цепи (кислотное изменение).

Как обсуждалось в настоящей заявке, разница pI, составляющая по меньшей мере 0,1, например, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5, между двумя полипептидными цепями, может

обеспечить разделение с помощью ионообменной хроматографии или изоэлектрофокусирования или других способов, чувствительных к изоэлектрической точке, известных в данной области. Следовательно, включение модификаций pI, которые изменяют pI каждой из полипептидных цепей, взаимодействующих друг с другом, например, первой и второй полипептидных цепей, описанных в настоящей заявке, так что каждая из указанных полипептидных цепей имеет разные pI и гетеромультимер, образованный указанными полипептидными цепями, также имеет особый pI, что облегчает изоэлектрическую очистку связывающих агентов, содержащих указанный гетеромультимер. Эти замены также помогают в определении и мониторинге любого контаминирующего нежелательного образования гомо- или гетеромультимера.

Модификации pI могут содержаться внутри одной или обеих цепей гетеромультимера, содержащего константные области тяжелой цепи, например, первой и второй полипептидных цепей связывающего агента по изобретению, а также внутри СН1, СН2 и/или СН3 и/или внутри пептидных линкеров, например, в качестве линкеров, соединяющих домены VH и VL фрагмента scFv. Например, варианты pI могут содержаться в первой полипептидной цепи и/или во второй полипептидной цепи связывающего агента по изобретению для уменьшения или предотвращения образования гомомультимера. Обычно, когда pI содержится как в первой, так и во второй полипептидной цепи, будут использоваться варианты pI, так что pI одной полипептидной цепи увеличивается, в то время как pI второй полипептидной цепи снижается. Это можно сделать, например, путем замены нейтрального аминокислотного остатка положительно или отрицательно заряженным аминокислотным остатком или наоборот, или путем изменения заряженного аминокислотного остатка с положительного на отрицательный заряд или наоборот, как обсуждается в настоящей заявке. Соответственно, в некоторых воплощениях настоящего изобретения обеспечивается достаточное изменение pI по меньшей мере в одной из полипептидных цепей связывающего агента, описанного в настоящей заявке, так что гетеромультимеры, например, первой и второй полипептидных цепей, могут быть очищены от гомомультимеров. В некоторых воплощениях в настоящем изобретении используется разница pI, составляющая всего лишь 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 или более в единицах pH. Количество модификаций pI, которые необходимо включить в одну или несколько полипептидных цепей связывающего агента по изобретению для обеспечения хорошего разделения, будет частично зависеть от исходного pI полипептидных цепей, pI областей СН, каркасных областей Fv и т.д., как будет понятно специалисту в данной области. Изменение pI можно рассчитать любым методом, известным в данной области техники, например, на основе областей СН, например, с

использованием способа, описанного Sillero и Maldonado (Sillero, Maldonado, (2006) *Comput. Biol. Med.* 36(2):157–166). Альтернативно, можно сравнить pI каждой полипептидной цепи. Кроме того, гетеромультимеры можно разделить по размеру.

В некоторых воплощениях модификации pI, асимметричные модификации, дополнительные модификации Fc или абляционные модификации и т.д. не включены в вариабельные области связывающего агента по изобретению.

В некоторых воплощениях модификации pI происходят из разных изотипов IgG, так что pI соответствующей полипептидной цепи изменяется без придания иммуногенности (см. 2014/0370013). Предпочтительно, чтобы модификации pI были получены из изотипов IgG человека, чтобы снизить риск придания иммуногенности. Обсуждаемые в данной заявке модификации описаны применительно к IgG1 человека, но таким образом можно изменить все изотипы IgG, а также гибриды изотипов. В случае, когда константный домен тяжелой цепи принадлежит IgG2-4, также можно использовать R133E и R133Q.

IgG1 является распространенным изотипом терапевтических антител по ряду причин, включая высокую эффекторную функцию. Однако область CH из IgG1 имеет более высокий pI, чем у IgG2. Путем введения остатков, полученных из IgG2, в определенные положения в основную цепь IgG1, pI полученного мономера снижается или увеличивается и, кроме того, может увеличиваться период полувыведения, определенный по сыворотке. Например, IgG1 человека содержит глицин (pI приблизительно 5,97) в положении 137 согласно нумерации EU, а IgG2 человека содержит глутаминовую кислоту (pI приблизительно 3,22) в соответствующем положении; замена остатка глутаминовой кислоты на остаток глицина повлияет на pI полученного полипептида. Снижение pI константной области антитела может также увеличить период полувыведения, определенный по сыворотке, *in vivo* (см. USSN 13/194,904; Ghetie and Ward, 1997, *Immunol Today*. 18(12): 592-598). Кроме того, вариабельные области с более низким pI могут увеличивать период полувыведения, определенный по сыворотке (см. Igawa et al., (2010) *PEDS* 23(5): 385-392).

В предпочтительной комбинации модификаций pI одна полипептидная цепь (например, первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, например, содержащая VH(CLDN18.2), CH1, CH2 и CH3) содержит остаток аспарагиновой кислоты в положении 208, остаток глутаминовой кислоты в положении 295, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 (т.е. N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D относительно IgG1 человека) согласно нумерации EU, и другая полипептидная цепь

(например, вторая полипептидная цепь указанного связывающего агента, например, содержащая VH(CD3) и VL(CD3), CH2 и CH3, и необязательно VH(CLDN18.2) и CH1) содержит положительно заряженный пептидный линкер, соединяющий VH(CD3) и VL(CD3) («линкер scFv»), такой как полипептидный линкер, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности (GKPGS)₄ или ее функционального варианта.

В полипептидных цепях, не содержащих CH1 и, следовательно, не включающих положение аминокислоты, соответствующее положению 208 по нумерации EU, могут использоваться следующие отрицательные модификации pI: остаток глутаминовой кислоты в положении 295, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 (IgG1 человека: Q295E/N384D/Q418E/N421D) согласно нумерации EU.

В некоторых воплощениях одна полипептидная цепь, например, первая полипептидная цепь, содержит набор вариантов, как обсуждается в настоящей заявке, и взаимодействующая с ней полипептидная цепь, например, вторая полипептидная цепь, содержит заряженный линкер scFv, такой как положительно заряженный линкер scFv, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 или их функционального варианта, или отрицательно заряженный линкер scFv, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 или их функционального варианта.

Ассиметричные модификации

«Ассиметричные модификации» представляют собой стерические модификации, которые облегчают взаимодействие полипептидных цепей, содержащих такие модификации. Одна стратегия, использующая стерические модификации, в данной области техники называется «выступами и впадинами», имея в виду инженерию аминокислот, при которой выпуклость вводится на первом полипептиде тяжелой цепи, обычно в области Fc (CH2-CH3) и соответствующая полость вводится во втором полипептиде тяжелой цепи, обычно в области Fc (CH2-CH3), так что выступ может быть расположен в полости на границе раздела этих двух тяжелых цепей, чтобы способствовать образованию гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера (см. USSN 61/596,846, Ridgway et al., (1996) Protein Engineering 9(7):617, Atwell et al., (1997) J. Mol. Biol. 270:26; Патент США № 8216805). «Выпуклости» создаются путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида с тяжелой цепью более крупными боковыми цепями. Компенсационные «полости» идентичного или подобного размера выступам создаются на границе раздела полипептида второй тяжелой цепи путем замены крупных боковых цепей аминокислот на более мелкие

(патент США 5731168). Модификации «выступы и впадины» могут быть объединены с дисульфидными связями для искажения образования гетеромультимеризации, например, гетеродимеризации указанных первых и вторых полипептидов тяжелой цепи (см. Merchant et al., (1998) Nature Biotech. 16:677).

Полезные ассиметричные модификации включают, без ограничения указанным, следующие пары двойных модификаций, где одна часть каждой пары двойных модификаций будет присутствовать в одной полипептидной цепи (например, первой полипептидной цепи, описанной в данной заявке) связывающего агента по изобретению, а вторая часть будет присутствовать в другой полипептидной цепи (например, второй полипептидной цепи, описанной в настоящей заявке) связывающего агента по изобретению: S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368D/K370S : S364K/E357Q; L368E/K370S : S364K; T411E/K360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L; K370S : S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W and T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C в соответствии с нумерацией EU и в отношении IgG1 человека. Предпочтительно в связывающем агенте по изобретению используется L368D/K370S : S364K/E357Q.

Описанные в данной заявке ассиметричные модификации также могут оказывать влияние на pI (см. Gunasekaran et al., (2010) J. Biol. Chem. 285(25):19637), и, следовательно, на очистку, и, следовательно, также могут рассматриваться как варианты pI.

Абляционные модификации

Под «абляцией» в данной заявке понимают снижение или прекращение активности. «Абляция связывания FcγR» означает, что область Fc, содержащая одну или несколько абляционных модификаций, имеет более чем 50% потерю активности связывания FcγR по сравнению с областью Fc, не содержащей специфических модификаций. Предпочтительно, чтобы область Fc, содержащая одну или несколько абляционных модификаций, имела более чем 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или даже большую потерю активности связывания FcγR. Предпочтительно, активность связывания FcγR области Fc, содержащей одну или несколько абляционных модификаций, по сравнению с областью Fc, не содержащей специфических модификаций, находится ниже уровня обнаруживаемого связывания в анализе Biacore, SPR или BLI.

Как известно, Fc-домен IgG1 человека обладает наибольшим связыванием с Fcγ-рецепторами, и, таким образом, можно использовать абляционные модификации, когда константные домены связывающего агента происходят из IgG1. Альтернативно или в дополнение к абляционным модификациям мутации в положении гликозилирования 297

(обычно в А или S) могут значительно ослаблять связывание, например, с FcγRIIIa. IgG2 и IgG4 человека естественным образом имеют более низкое связывание с Fcγ-рецепторами (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725), и, таким образом, домены CH1, CH2 и CH3, полученные из IgG2 или IgG4, можно использовать с абляционными модификациями или без них в связывающих агентах по изобретению. Модификации аминокислот, которые устраняют связывание FcγR, описаны, например, в Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) и Hezareh M, J Virol.; 75(24):12161-12168 (2001).

Таким образом, Fc-часть связывающего агента по изобретению может содержать одну или несколько «абляционных модификаций FcγR» или «модификаций с нокаутом Fc (FcKO или KO)». В некоторых воплощениях желательно уменьшить или удалить связывание домена Fc с одним или несколькими или всеми рецепторами Fcγ (например, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и т.д.). В некоторых воплощениях желательно устранить связывание FcγRIIIa связывающих агентов, которые моновалентно связывают CD3, таких как связывающие агенты по настоящему изобретению, для устранения или значительного снижения активности АЗКЦ. Таким образом, в связывающих агентах по изобретению одна или несколько полипептидных цепей, например, первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь, связывающего агента по изобретению содержат один или несколько абляционных вариантов FcγR. В предпочтительных воплощениях один или несколько абляционных вариантов выбраны из группы, состоящей из G236R, S239G, S239K, S239Q, S239R, V266D, S267K, S267R, H268K, E269R, 299R, 299K, K322A, A327G, A327L, A327N, A327Q, L328E, L328R, P329A, P329H, P329K, A330L, A330S/P331S, I332K, I332R, V266D/A327Q, V266D/P329K, S267R/A327Q, S267R/P329K, G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236_/S267K, E233P/L234V/L235A/G236_/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del, S239K/S267K, 267K/P329K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G и E233P/L234V/L235A/G236del в соответствии с нумерацией EU и относительно IgG1 человека, где «del» представляет собой делецию аминокислоты в указанной позиции. Предпочтительно, чтобы модификации E233P/L234V/L235A/G236_/S267K согласно нумерации EU и в отношении IgG1 человека использовались как в первой, так и во второй полипептидной цепи связывающего агента по изобретению. Следует отметить, что описанные в данной заявке абляционные модификации устраняют связывание FcγR, но обычно не связывание FcRn. Однако методы уменьшения или увеличения связывания с FcRn с целью уменьшения или увеличения периода полувыведения связывающего агента

в сыворотке известны и могут быть использованы (см., например, Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24; Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176:346-56; и Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28:157-9).

Например, в связывающем агенте по изобретению первая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 28, а вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30, где первая и вторая полипептидные цепи содержат набор ассиметричных модификаций L368D/K370S:S364K/E357Q, первая полипептидная цепь дополнительно содержит набор модификаций pI N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, и как первая, так и вторая полипептидные цепи дополнительно включают комплект абляционных модификаций E233P/ L234V/L235A/G236del/S267K, например, при этом первая полипептидная цепь содержит VH(CLDN18.2) и CH1, а вторая полипептидная цепь содержит scFv(CD3) и необязательно VH(CLDN18.2) и CH1. Конечно, дополнительные модификации могут быть включены в аминокислотные последовательности соответствующего связывающего агента; например, связывающий агент может содержать дополнительные модификации аминокислот, такие как замены, в дополнение к модификациям, обсуждаемым выше.

Дополнительные модификации Fc

В дополнение к другим модификациям, описанным в настоящей заявке, таким как модификации pI, ассиметричные модификации и абляционные модификации, можно использовать ряд полезных модификаций, которые изменяют связывание одного или нескольких рецепторов FcγR, изменяют связывание с рецепторами FcRn и т.д.

Соответственно, существует ряд полезных аминокислотных замен, которые можно сделать для изменения связывания связывающих агентов по изобретению с одним или несколькими рецепторами FcγR. Могут быть полезны замены, которые приводят как к увеличению связывания, так и к снижению связывания. Например, известно, что усиление связывания с FcγRIIIa приводит к увеличению АЗКЦ. Аналогичным образом, снижение связывания с FcγRIIb также может быть полезным. Аминокислотные замены, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают замены, перечисленные в USSN 11/124620, 11/174287, 11/396495, 11/538406, все из которых полностью включены в данную заявку ссылкой. Конкретные полезные аминокислотные замены, которые могут быть включены в связывающие агенты по изобретению, включают, без ограничения указанным, 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D/332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264B и 299T.

Кроме того, существуют дополнительные модификации, которые полезны для увеличения связывания с FcRn и увеличения периода полувыведения в сыворотке, как описано в USSN 12/341769, включенном в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте, включая, без ограничения указанным, 434S, 434A, 428L, 308F., 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I/434S, 436V/434S, 436V/428L и 259I/308F/428L в соответствии с нумерацией EU.

Кроме того, CH3 на одной или обеих полипептидных цепях, предпочтительно на обеих полипептидных цепях, образующих гетеродимер Fc, может содержать модификации M428L/N434S, приводящие к более длительному периоду полувыведения в сыворотке.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, обсуждаемые в данной заявке модификации можно независимо комбинировать с другими модификациями. В одном воплощении одна полипептидная цепь связывающего агента по настоящему изобретению (например, первая полипептидная цепь) содержит N208D, Q295E, N384D, Q418E и N481D в соответствии с нумерацией EU, а также другую полипептидную цепь связывающего агента (например, вторую полипептидную цепь) содержит положительно заряженный линкер scFv, как описано в настоящей заявке. Предпочтительно, чтобы первая полипептидная цепь связывающего агента дополнительно содержала K370S и L368D, а вторая полипептидная цепь связывающего агента дополнительно содержала E357Q и S364K согласно нумерации EU. Кроме того, в предпочтительном воплощении как первая, так и вторая полипептидные цепи дополнительно содержат E233P, L234V, L235A, G236del и S267K согласно нумерации EU. Наиболее предпочтительно первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению содержит N208D, E233P, L234V, L235A, G236del, S267K, Q295E, L368D, K370S, N384D, Q418E и N481D, а вторая полипептидная цепь связывающего агента содержит E233P, L234V, L235A, G236del, S267K, E357Q и S364K и, необязательно, C220S для удаления цистеина, который обычно образует пару с легкой цепью.

Термин «моноклональный связывающий агент», используемый в данной заявке, включает «моноклональное антитело» и относится к препарату молекул связывающего агента одинакового молекулярного строения. Композиция моноклонального связывающего агента демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к связывающим агентам, проявляющим единственную специфичность связывания, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Человеческие моноклональные связывающие агенты могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющая геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, объединенную с иммортализованной клеткой.

Термин «рекомбинантный связывающий агент», используемый в данной заявке, включает «рекомбинантное антитело» и включает все связывающие агенты, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (а) связывающие агенты, выделенные из животного (например, мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными по отношению к генам иммуноглобулина или полученной из них гибридоме, (b) связывающие агенты, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии связывающего агента, например, из трансфектомы, (с) связывающие агенты, выделенные из рекомбинантной библиотеки комбинаторных антител и (d) связывающие агенты, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК.

Термин «человеческий связывающий агент», используемый в настоящей заявке, включает «человеческое антитело» и предназначен для включения связывающих агентов, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие связывающие агенты могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вызванные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*).

Термин «гуманизированный связывающий агент», используемый в настоящей заявке, включает «гуманизированное антитело» и относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий сайт, который по существу получен из иммуноглобулина вида животного, не являющегося человеком, где остальная иммуноглобулиновая структура молекулы основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Это может быть достигнуто путем прививки шести областей, определяющих комплементарность (CDR) нечеловеческих антител, которые вместе образуют сайт связывания антигена, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Сайт связывания антигена может содержать либо полные переменные домены, объединенные с константными доменами, либо только области, определяющие комплементарность (CDR), привитые к соответствующим

каркасным областям в переменных доменах. Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного связывающего агента, может потребоваться замена каркасными остатками из исходного связывающего агента (т.е. нечеловеческого связывающего агента, например, мышиногo антитела) остатков в каркасных областях человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств связывающего агента. Сайты связывания антигена могут быть сайтами дикого типа или модифицированными одной или несколькими аминокислотными заменами, например, модифицированными для более близкого сходства с иммуноглобулинами человека. Некоторые формы гуманизированных связывающих агентов сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышиногo антитело, которое содержит все шесть CDR мышиногo антитела). Другие формы имеют один или несколько CDR, измененных по отношению к исходному связывающему агенту, например, антителу. Таким образом, гуманизированный связывающий агент может содержать нечеловеческие CDR-последовательности, в первую очередь человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или несколько обратных мутаций аминокислот в нечеловеческой аминокислотной последовательности, и полностью человеческие константные области.

Термин «химерный связывающий агент», используемый в настоящей заявке, включает «химерное антитело» и относится к тем связывающим агентам, в которых одна часть каждой из аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей гомологична соответствующим последовательностям в связывающих агентах, например, антителах, происходят от определенного вида или принадлежат к определенному классу, тогда как оставшийся участок цепи гомологичен соответствующим последовательностям другого. Обычно переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных от одного вида млекопитающих, тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных от другого вида. Одним из явных преимуществ таких химерных форм является то, что переменную область можно легко получить из известных в настоящее время источников с использованием легкодоступных В-клеток или гибридом из организмов-хозяев, отличных от человека, в сочетании с константными областями, полученными, например, из препаратов клеток человека. Хотя переменная область имеет преимущество, заключающееся в простоте получения, и на специфичность не влияет источник, константная область, являющаяся человеческой, с меньшей вероятностью вызовет иммунный ответ у человека при инъекции связывающих агентов, чем константная область

из нечеловеческого источника. Однако указанное определение не ограничивается этим конкретным примером.

Связывающие агенты или их фрагменты, например, переменные и/или константные области, могут быть получены из разных видов, включая, без ограничения указанным, мышь, крысу, кролика, морскую свинку и человека.

Иммуноглобулины, описанные в настоящей заявке, включают антитела IgA, такие как IgA1 или IgA2, IgG1 (включая аллотипы с полиморфизмами в положении аминокислот 356 (D или E) и 358 (L или M) в соответствии с нумерацией EU), IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM и IgD. В различных воплощениях иммуноглобулинов представляет собой антитело IgG1, более конкретно изотип IgG1 каппа или IgG1 лямбда (т.е. IgG1, κ , λ), антитело IgG2a (например, IgG2a, κ , λ), антитело IgG2b (например, IgG2b, κ , λ), антитело IgG3 (например, IgG3, κ , λ) или антитело IgG4 (например, IgG4, κ , λ). Аминокислотные последовательности, описанные в данной заявке в отношении аллотипа 356D/358M IgG1, также включают аллотип 356E/358L.

Термин «модификация подкласса IgG» или «модификация изотипа» означает модификацию аминокислоты, которая превращает одну аминокислоту одного изотипа IgG в соответствующую аминокислоту другого, выровненного изотипа IgG. Например, поскольку IgG1 содержит тирозин, а IgG2 — фенилаланин в положении аминокислоты 296 согласно нумерации EU, замена F296Y в IgG2 считается модификацией подкласса IgG.

Используемый в данной заявке термин «гетерологичный связывающий агент» включает «гетерологичное антитело» и определяется в отношении трансгенного организма, продуцирующего такой связывающий агент. Этот термин относится к связывающему агенту, имеющему аминокислотную последовательность или кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую той, которая обнаружена в организме, не состоящем из трансгенного организма, и обычно полученном из вида, отличного от трансгенного организма.

Используемый в данной заявке термин «гетерогибридный связывающий агент» включает «гетерогибридное антитело» и относится к связывающему агенту, имеющему легкие и тяжелые цепи различного организменного происхождения. Например, антитело, имеющее тяжелую цепь человека, связанную с легкой цепью мыши, представляет собой гетерогибридное антитело.

Связывающие агенты, включая описанные в данной заявке антитела, предпочтительно выделяют. Термин «выделенный», используемый в настоящей заявке, относится к связывающему агенту, который по существу не содержит других агентов,

обладающих различной антигенной специфичностью (например, выделенный связывающий агент, который специфически связывается с CLDN18.2 и CD3, по существу не содержит связывающих агентов, которые специфически связываются с CLDN18.2 и CD3). Однако выделенный связывающий агент, который специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого CLDN18.2, может обладать перекрестной реактивностью по отношению к другим родственным антигенам, например, из других видов (например, видовым гомологам CLDN18.2). Более того, выделенный связывающий агент может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термины «антигенсвязывающая часть» связывающего агента, такого как антитело (или просто «связывающая часть») или «антигенсвязывающий фрагмент» связывающего агента, такого как антитело (или просто «связывающий фрагмент»), или подобные термины, относятся к одному или нескольким фрагментам связывающего агента, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» связывающего агента, такого как антитело, включают (i) Fab-фрагменты, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH; (ii) F(ab')₂-фрагменты, бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fab', полученные из фрагмента F(ab')₂ и содержащие свободную сульфгидрильную группу, которую можно алкилировать или использовать в конъюгации с ферментом, токсином или другим представляющим интерес белком, где Fab' может содержать небольшую часть Fc; (iv) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH; (v) фрагменты Fv, состоящие из доменов VL и VH одного плеча антитела, (vi) фрагменты dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), которые состоят из домена VH; (vii) выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и (viii) комбинации двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить рекомбинантными методами с помощью синтетического линкера, который позволяет создавать из них единую белковую цепь, в которой VL и домены VH соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент» связывающего агента, такого как антитело. Другим

примером являются гибридные белки связывающего домена иммуноглобулина, содержащие (i) полипептид связывающего домена, который объединен с полипептидом шарнирной области иммуноглобулина, (ii) константную область CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая объединена с шарнирной областью, и (iii) константную область CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, которая объединена с константной областью CH2. Полипептид связывающего домена может представлять собой переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. Слитые белки связывающего домена иммуноглобулина дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают с помощью традиционных методов известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность так же, как и интактные антитела.

Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой белок слияния переменных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулинов, соединенных с коротким линкерным пептидом, обычно содержащим от десяти до около 30 аминокислот, таким как линкер scFv, например, представленный SEQ ID NO: 2-20. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может либо соединять N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Двухвалентные (или бивалентные) одноцепочечные переменные фрагменты (ди-scFv, би-scFv) можно сконструировать путем связывания двух scFv. Это можно сделать путем получения одной пептидной цепи с двумя доменами VH и двумя доменами VL, что дает тандемные scFv. Изобретение также включает мультиспецифические молекулы, содержащие более одного связывающего домена scFv. Одним из распространенных гибких связывающих пептидов является (G4S)_x, где x может иметь значение 2, 3, 4, 5 или 6. Предпочтительно линкер, соединяющий домены VH и VL scFv, включает аминокислотную последовательность (GKPGS)_x или ее функциональный вариант, предпочтительно состоит из нее, где x может иметь значение 2, 3, 4, 5 или 6. Необязательно, ассоциация VH и VL может быть стабилизирована одной или несколькими межмолекулярными дисульфидными связями.

Другая возможность — создание scFv с линкерными пептидами, которые слишком коротки для сворачивания двух переменных областей (около пяти аминокислот), что приводит к димеризации scFv. Этот тип известен как диатела. Еще более короткие линкеры (одна или две аминокислоты) приводят к образованию тримеров, так называемых триател или трител. Также производятся тетратела. Они проявляют еще большую аффинность к своим целям, чем диатела.

Термин «специфичность», используемый в настоящей заявке, имеет следующее значение, если это не противоречит контексту. Два связывающих агента имеют «одинаковую специфичность», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом.

Используемый в данной заявке термин «связывающий домен» или «антигенсвязывающий домен» относится к сайту, например, связывающего агента, такого как антитело, которое связывается с антигеном и включает антигенсвязывающую часть связывающего агента. Связывающий домен может состоять из переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL), каждый из которых включает четыре консервативные каркасные области (FR) и три CDR. CDR различаются по последовательности и определяют специфичность к конкретному антигену. Домены VH и VL вместе могут образовывать сайт, который специфически связывает конкретный антиген. «Связывающий домен со специфичностью» к антигену является специфичным для указанного антигена, если связывающий агент, содержащий указанный связывающий домен, связывается с указанным антигеном через указанный связывающий домен в стандартных анализах, например, с KD около 10^{-7} М или менее, при том, что указанный связывающий домен не связывается в значительной степени, в частности, не связывается детектируемым образом через указанный связывающий домен с антигенами, отличными от указанного антигена, к которому связывающий домен специфичен в стандартных анализах. Конечно, если связывающий агент содержит более одного связывающего домена с различной специфичностью, он будет связываться более чем с одним антигеном со специфичностью, как описано в настоящей заявке. Связывание связывающего агента с антигеном можно определить, например, с помощью биослойной интерферометрии (BLI) или, например, с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе BIAcore 3000, используя антиген в качестве лиганда и связывающего агента в качестве аналита.

Фрагменты антитела Fab (участок связывания антигена) представляют собой иммунореактивные полипептиды, содержащие моновалентные антигенсвязывающие домены антитела, состоящего из полипептида, состоящего из переменной области тяжелой цепи (VH) и части константной области 1 тяжелой цепи (CH1), и полипептида, состоящего из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (в которой части CL и CH1 связаны вместе, например, дисульфидной связью между остатками Cys). Предпочтительно в описанных в данной заявке Fab-фрагментах CH1 и CL имеют человеческое происхождение. В одном воплощении CL представляет собой CL

каппа-типа. В одном воплощении CH1 получен из IgG1, предпочтительно из IgG1 человека.

Все антитела и производные антител, такие как фрагменты антител, как описано в данной заявке для целей изобретения, охватываются термином «антитело». Термин «производные антитела» относится к любой модифицированной форме антитела, например, конъюгату антитела и другого агента или антитела, или фрагменту антитела. Кроме того, антитела и производные антител, описанные в настоящей заявке, полезны для получения связывающих агентов по изобретению.

Природные антитела обычно моноспецифичны, то есть они связываются с одним антигеном. В настоящем изобретении предлагаются связывающие агенты, которые связываются с цитотоксической клеткой, такой как Т-клетка (путем взаимодействия с рецептором CD3), и клеткой-мишенью, такой как раковая клетка (путем взаимодействия с CLDN18.2). Связывающие агенты по настоящему изобретению связываются по меньшей мере с двумя различными типами антигенов и являются по меньшей мере биспецифичными или мультиспецифичными, например, триспецифичными, тетраспецифичными и т.д.

Связывающий агент по настоящему изобретению может быть по меньшей мере двухвалентным. В одном воплощении связывающий агент по настоящему изобретению является по меньшей мере трехвалентным. Используемые в данной заявке термины «валентный», «валентность», «валентности» или другие их грамматические варианты означают количество антигенсвязывающих сайтов или связывающих доменов в связывающем агенте. Сайты связывания антигена, связывающиеся с одним и тем же антигеном, могут распознавать разные эпитопы или предпочтительно один и тот же эпитоп. В данной области известны трехвалентные биспецифические антитела и четырехвалентные биспецифические антитела. Связывающий агент по настоящему изобретению также может иметь валентность выше 4.

Описываемый в данной заявке связывающий агент предпочтительно представляет собой искусственный белок (в том числе комплексы белка), который может состоять из фрагментов по меньшей мере двух разных антител (указанные фрагменты по меньшей мере двух разных антител, образующих по меньшей мере два разных связывающих домена) и, следовательно, связываться по меньшей мере с двумя разными типами антигена. Связывающий агент по изобретению разработан для одновременного связывания с иммунной клеткой, такой как иммунная эффекторная клетка, в частности с Т-клеткой, такой как цитотоксическая клетка (например, путем связывания с CD3), и

разрушаемой клеткой-мишенью, такой как раковая клетка (например, путем связывания с CD3) путем связывания с опухолеассоциированным антигеном CLDN18.2).

Было разработано несколько типов двухвалентных и трехвалентных антител, и все типы входят в объем настоящего изобретения. Биспецифические полноразмерные антитела можно получить путем ковалентного связывания двух моноклональных антител или с помощью традиционных гибридомных методов. Ковалентное связывание двух моноклональных антител описано в Anderson, Blood 80 (1992), 2826-34. Другим примером фрагмента биспецифического антитела является диатела (Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772), который представляет собой небольшой фрагмент бивалентного и биспецифического антитела. Диатела содержат варибельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с варибельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL), соединенный пептидным линкером, который слишком короткий, чтобы обеспечить образование пар между двумя доменами в одной и той же цепи. Это вызывает спаривание с комплементарными доменами другой цепи и способствует сборке димерной молекулы с двумя функциональными антигенсвязывающими сайтами.

В биспецифических молекулах, содержащих два Fab-фрагмента, каждый из отдельных Fab-фрагментов может быть расположен в одной цепи, предпочтительно VL-CL-CH-VH, и отдельные варибельные и константные домены могут быть связаны с пептидным линкером, таким как пептид линкер, обсуждаемый в данной заявке. В общем, отдельные одиночные цепи и Fab-фрагменты могут быть соединены посредством дисульфидных связей, адгезивных доменов, химически связанных и/или пептидных линкеров. Биспецифическая молекула также может содержать более двух Fab-фрагментов, в частности, молекула может представлять собой Fab3, Fab4 или мультимерный комплекс Fab со специфичностью к 2, 3, 4 или более различным антигенам. Изобретение также включает химически связанные Fab.

Тройные антитела или тройные одноцепочечные антитела (scctbs) состоят из трех отдельных областей scFv, соединенных линкерными последовательностями. Кроме того, природная гетеродимеризация *in vivo* тяжелой цепи (CH1) и легкой цепи (CL) может быть использована для формирования каркаса, к которому можно добавлять несколько scFv. Например, scFv, специфичный к одному антигену, может быть связан с CH1, который также связан с scFv, специфичным к другому антигену, и эта цепь может взаимодействовать с другой цепью, содержащей scFv, специфичный к любому антигену, связанному с CL (scFv3-CH1/CL). Другой пример трехвалентной конструкции включает использование Fab-фрагмента, специфичного к одному эпитопу, связанного через C-конец с двумя scFv, специфичными к другому эпитопу, по одному на каждой цепи (Fab-scFv2).

Еще один пример трехвалентной конструкции включает использование двух Fab-фрагментов, специфичных к одному антигену или эпитопу, при этом один из Fab-фрагментов связан по С-концу с одним scFv, специфичным к другому антигену или эпитопу (Fab2-scFv). Еще один пример трехвалентной (или четырехвалентной) молекулы включает множество форматов, которые содержат дополнительные связывающие элементы, прикрепленные к N- или С-концам антител. Например, один формат состоит из интактной молекулы антитела, специфичной к одному антигену, с одноцепочечным Fab (scFab), связанным с С-концом молекулы (IgG-scFab). Подход «dock-and-lock» (DNL) также использовался для получения трехвалентных антител (DNL-F(ab)₃) (Chang, C.-H. et al. In: *Bispecific Antibodies*. Kontermann R. E. (ed.), Springer Heidelberg Dordrecht London New York, pp. 199-216 (2011)). Каждое из вышеуказанных антител входит в объем настоящего изобретения.

Также были созданы четырехвалентные антитела, и все их типы входят в объем настоящего изобретения. Примеры четырехвалентных антител включают, без ограничения указанным, молекулы scFv2-Fc, F(ab')₂-scFv2, scFv2-H/L и scFv-dhlx-scFv. Биспецифические конструкции scFv2-Fc имеют Fc-домен с двумя scFv, специфичными к одной молекуле, связанными с N-концами цепей Fc, и двумя другими scFv, специфичными к другой молекуле, связанной с С-концами цепи Fc. Биспецифические конструкции F(ab')₂-scFv2 включают фрагменты scFv, связанные с С-концом фрагмента F(ab')₂. В конструкциях scFv2-H/L scFv, специфичные к одной молекуле, связаны с тяжелыми цепями, тогда как scFv, специфичные к другой молекуле, связаны с легкими цепями. Наконец, конструкции scFv-dhlx-scFv содержат один тип scFv, связанный с доменом спиральной димеризации, за которым следует другой тип scFv. Две цепи этого типа могут димеризоваться, образуя четырехвалентное антитело.

Связывающий агент по изобретению может иметь форму молекулы антитела или антителоподобной молекулы, или белкового каркаса с антителоподобными свойствами, или циклического пептида с по меньшей мере двумя специфичностями связывания. Таким образом, связывающий агент может содержать одно или несколько антител, описанных в настоящей заявке, или их функциональные фрагменты.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению содержит тяжелую цепь (фрагмент Fd) и легкую цепь (L) фрагмента Fab, которые способны взаимодействовать и благодаря которым могут быть включены дополнительные связывающие функции или домены. Такие дополнительные связывающие домены могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из связывающих доменов, содержащих две переменные области антитела, таких как связывающие домены scFv, т.е. VH-VL или VL-VH, и связывающих

доменов, содержащих одну переменную область антитела, таких как связывающие домены VH и связывающие домены VHH.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению находится в формате конструкции Fab-scFv, т.е. конструкции, содержащей Fab-фрагмент (содержащий домены VH и CH1 на одной полипептидной цепи и соответствующие домены VL и CL на другой полипептидной цепи, где антигенсвязывающий домен образуется в результате взаимодействия указанных полипептидных цепей) и фрагмент scFv (содержащий домены VH и VL, соединенные друг с другом полипептидным линкером на одной и той же полипептидной цепи, где VH и VL взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего домена). В одном воплощении связывающий агент по изобретению представляет собой тример, состоящий из трех полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит VH, полученную из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина с первой специфичностью, второй полипептид содержит фрагмент scFv, содержащий VH, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина со второй специфичностью, и VL, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина со второй специфичностью, а третья полипептидная цепь содержит VL, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина с первой специфичностью. В одном воплощении первая полипептидная цепь дополнительно содержит CH1, полученный из иммуноглобулина, а третья полипептидная цепь дополнительно содержит CL, полученный из иммуноглобулина. В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи дополнительно содержат домены CH2 и CH3 (CH2-CH3), полученные из иммуноглобулина, например, С-концевые по отношению к Fab-фрагменту и фрагменту scFv, соответственно. Таким образом, в одном воплощении связывающий агент по изобретению содержит первую полипептидную цепь, содержащую VH-CH1, соединенную с CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, содержащую фрагмент scFv (VH-VL или VL-VH), соединенный с CH2-CH3, и третья полипептидная цепь, содержащая VL-CL. В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью. В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь взаимодействует с третьей полипептидной цепью. В одном воплощении первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь взаимодействуют, а первая полипептидная цепь дополнительно взаимодействует с третьей полипептидной цепью. В одном воплощении CH2 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH2 на второй полипептидной цепи и/или CH3 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH3 на второй полипептидной цепи. В некоторых воплощениях VH на первой полипептидной цепи взаимодействует с VL на третьей полипептидной цепи с

образованием связывающего домена и/или СН1 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CL на третьей полипептидной цепи. В некоторых воплощениях дисульфидный мостик образуется между остатком цистеина в CL и остатком цистеина в СН1. Одна или обе полипептидные цепи, содержащие СН2-СН3, могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот, например, модификаций Fc, описанных в настоящей заявке, таких как модификация pI, ассиметричная модификация, дополнительные модификации Fc и абляционная модификация, например, для стимулирования взаимодействия полипептидных цепей. Согласно изобретению VH и VL фрагмента scFv предпочтительно соединены пептидным линкером («линкер scFv»). В некоторых воплощениях СН1 в первой полипептидной цепи соединен с СН2 в той же полипептидной цепи с помощью пептидного линкера. В некоторых воплощениях scFv соединен с СН2 посредством пептидного линкера.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению имеет формат конструкции Fab2-scFv, т.е. конструкции, содержащей два Fab-фрагмента (каждый из которых содержит домены VH и СН1 на одной полипептидной цепи и соответствующие домены VL и CL на другой полипептидной цепи, при этом антигенсвязывающий домен образуется в результате взаимодействия каждого из указанного набора полипептидных цепей) и фрагмент scFv (содержащий домены VH и VL, соединенные друг с другом полипептидным линкером на одной и той же полипептидной цепи, где VH и VL взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего домена). В одном воплощении связывающий агент по изобретению представляет собой тетрамер, состоящий из четырех полипептидных цепей, где первая полипептидная цепь содержит VH, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина с первой специфичностью, второй полипептид содержит VH, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина с первой специфичностью, и фрагмент scFv, содержащий VH, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина со второй специфичностью, и VL, полученный из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина со второй специфичностью, третья полипептидная цепь содержит VL, полученную из иммуноглобулина, например, иммуноглобулина с первой специфичностью, а четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи. В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи дополнительно содержат СН1, полученный из иммуноглобулина, например, С-концевой по отношению к VH, полученный из иммуноглобулина с первой специфичностью, а третья и четвертая полипептидные цепи дополнительно содержат CL, полученный из иммуноглобулина. В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи дополнительно содержат домены СН2 и СН3 (СН2-

CH3), полученные из иммуноглобулина, например, С-концевые по отношению к Fab-фрагменту и фрагменту scFv, соответственно. Таким образом, в одном воплощении связывающий агент по изобретению содержит первую полипептидную цепь, содержащую VH-CH1, соединенную с CH2-CH3, вторую полипептидную цепь, содержащую VH-CH1, соединенную с фрагментом scFv (VH-VL или VL-VH), соединенным с CH2-CH3, а также третью и четвертую полипептидные цепи, каждая из которых содержит VL-CL. В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью. В некоторых воплощениях первая полипептидная цепь взаимодействует с третьей полипептидной цепью. В некоторых воплощениях вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью. В одном воплощении первая и вторая полипептидные цепи взаимодействуют, первая полипептидная цепь дополнительно взаимодействует с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь дополнительно взаимодействует с четвертой полипептидной цепью. В одном воплощении CH2 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH2 на второй полипептидной цепи, и/или CH3 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CH3 на второй полипептидной цепи. В некоторых воплощениях VH на первой полипептидной цепи взаимодействует с VL на третьей полипептидной цепи с образованием связывающего домена, и/или CH1 на первой полипептидной цепи взаимодействует с CL на третьей полипептидной цепи. В некоторых воплощениях VH на второй полипептидной цепи (которая не является частью фрагмента scFv) взаимодействует с VL на четвертой полипептидной цепи с образованием связывающего домена, и/или CH1 на второй полипептидной цепи взаимодействует с CL на четвертой полипептидной цепи. В некоторых воплощениях дисульфидный мостик образуется между остатком цистеина в CL и остатком цистеина в CH1. Одна или обе полипептидные цепи, содержащие CH2-CH3, могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот, например, модификаций Fc, описанных в настоящей заявке, таких как модификация pI, ассиметричная модификация, дополнительные модификации Fc и абляционная модификация, например, для стимулирования взаимодействия полипептидных цепей. Согласно изобретению VH и VL фрагмента scFv предпочтительно соединены пептидным линкером («линкер scFv»). В некоторых воплощениях CH1 в первой и/или второй полипептидной цепи соединен с CH2 в той же полипептидной цепи с помощью пептидного линкера. В некоторых воплощениях scFv соединен с CH2 посредством пептидного линкера.

В предпочтительном воплощении бивалентных связывающих агентов по изобретению (в формате Fab-scFv) VH на первой полипептидной цепи и VL на третьей

полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, а VH и VL scFv на второй полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3. Однако в некоторых воплощениях связывающий домен, образованный VH на первой полипептидной цепи и VL на третьей полипептидной цепи, обладает специфичностью к CD3, а связывающий домен, образованный VH и VL scFv на второй полипептидной цепи, обладает специфичностью к CLDN18.2. В другом предпочтительном воплощении трехвалентных связывающих агентов по изобретению (в формате Fab2-scFv) дополнительный VH на второй полипептидной цепи, который не является частью scFv, и VL на четвертой полипептидной цепи предпочтительно взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2. Однако в объем настоящей заявки входят также связывающие агенты, в которых связывающие домены, образованные scFv на второй полипептидной цепи и VH и VL на первой и третьей полипептидных цепях, обладают специфичностью к CLDN18.2, а связывающий домен, образованный VH на второй полипептидной цепи, которая не является частью scFv, и VL на четвертой полипептидной цепи, обладает специфичностью к CD3.

Термин «линкер» относится к любому средству, которое служит для соединения двух различных функциональных единиц (например, доменов или областей полипептидной цепи). Типы линкеров включают, без ограничения указанным, химические линкеры, пептидные и полипептидные линкеры. Последовательности пептидных и полипептидных линкеров не ограничены. Пептидные линкеры предпочтительно являются неиммуногенными и гибкими, например, те, которые содержат последовательности серина и глицина. В зависимости от конкретной конструкции линкеры могут быть длинными или короткими.

В предпочтительных воплощениях линкер scFv, т.е. линкер, соединяющий VH и VL, которые образуют фрагмент scFv, предпочтительно содержит и предпочтительно состоит из гибкого пептидного линкера, как описано в настоящей заявке, предпочтительно аминокислотной последовательности (GKPGS)_x или ее функционального варианта, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6. В еще более предпочтительном воплощении линкер scFv включает аминокислотную последовательность (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 11) или ее функциональный вариант и предпочтительно состоит из нее. Предпочтительно фрагмент scFv соединен с CH₂ второй полипептидной цепи с помощью пептидного линкера, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 27), EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 22) и (G4S)₂KTHTCPPC (SEQ ID NO: 23) или их функционального варианта.

Другие полезные линкеры включают линкеры, имеющие аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 24 и 25.

Согласно изобретению линкер, соединяющий scFv и CH1, предпочтительно на С-конце CH1, предпочтительно содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности (G4S)_x или ее функционального варианта, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно (G4S)₂ (SEQ ID NO: 26) или ее функционального варианта. Согласно изобретению линкер, соединяющий CH2 и scFv, предпочтительно на N-конце CH2, предпочтительно содержит и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 27), EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 22) и (G4S)₂KTHTCPPC (SEQ ID NO: 23) или их варианта. Согласно изобретению линкер, соединяющий CH1 и CH2, предпочтительно содержит и предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности EPKSCDKTHTCPPCP или ее функционального варианта. Согласно изобретению CH1 и scFv, например, на второй полипептидной цепи, соединены пептидным линкером, предпочтительно содержащим, предпочтительно состоящим из аминокислотной последовательности (G4S)₂ (SEQ ID NO: 26) или ее функционального варианта. Однако можно использовать и другие линкеры, известные в данной области.

В одном воплощении связывающий агент по настоящему изобретению содержит первую, вторую и третью полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:
VH(CLDN18.2)-CH1-CH2-CH3,

ii) вторая полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:

VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3, и

iii) третья полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:

VL(CLDN18.2)-CL,

предпочтительно, когда VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3, и домены на полипептидных цепях предпочтительно соединены друг с другом пептидными линкерами, как описано в данной заявке.

В другом воплощении связывающий агент по изобретению содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:

VH(CLDN18.2)-CH1-CH2-CH3,

ii) вторая полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:

VH(CLDN18.2)-CH1-VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или VH(CLDN18.2)-CH1-VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3,

iii) третья полипептидная цепь содержит от N-конца до С-конца следующие домены:

VL(CLDN18.2)-CL, а

iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи,

причем предпочтительно, где VH(CLDN18.2) на первой полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на третьей полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, VH(CLDN18.2) на второй полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на четвертой полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3, и домены на полипептидных цепях предпочтительно соединены друг с другом пептидными линкерами, как описано в данной заявке.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению содержит: а) первую полипептидную цепь, содержащую VH(CLDN18.2), а также CH1, CH2 и CH3, содержащие остаток аспарагиновой кислоты в положении 208, остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делецию в положении 236, остаток лизина в положении 267, остаток глутаминовой кислоты в положении 295, остаток аспарагиновой кислоты в положении 368, остаток серина в положении 370, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 согласно нумерации EU; б) вторую полипептидную цепь, содержащую VH(CD3) и VL(CD3), соединенные друг с другом через заряженный линкер scFv с аминокислотной последовательностью (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 11) и CH2 и CH3, содержащими остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делецию в положении 236, остаток лизина в положении 267, остаток глутамин в положении 357 и остаток лизина в положении 364 согласно нумерации EU; и с) третью полипептидную цепь, содержащую VL(CLDN18.2) и CL. В одном воплощении вторая полипептидная цепь дополнительно содержит VH(CLDN18.2) и CH1, как описано в настоящей заявке, а связывающий агент дополнительно содержит четвертую полипептидную цепь, идентичную третьей полипептидной цепи.

Другие воплощения включают форматы Fab2-scFv, которые содержат: а) первую полипептидную цепь, содержащую VH(CLDN18.2) и CH1, CH2 и CH3, которая содержит косые модификации L368D/K370S, pI-модификации N208D/Q295E/N384D/Q418E /N421D, абляционные модификации E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, дополнительные Fc-модификации M428L/N434S; б) вторую полипептидную цепь, содержащую VH(CD3) и VL(CD3) и CH2 и CH3, которая содержит ассиметричные модификации S364K/E357Q, абляционные модификации E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, дополнительные модификации Fc M428L/N434S и VH (CLDN18.2) и; в) третью полипептидную цепь, содержащую VL(CLDN18.2) и CL; и d) четвертую полипептидную цепь, идентичную третьей полипептидной цепи.

В одном воплощении связывающий агент по настоящему изобретению содержит первую, вторую и третью полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер-CH2-CH3,

ii) вторая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CD3)-линкер-VL(CD3)-линкер-CH2-CH3 или VL(CD3)-линкер-VH(CD3)-линкер-CH2-CH3, и

iii) третья полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VL(CLDN18.2)-CL,

предпочтительно, где VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, а VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3.

В одном воплощении связывающий агент по настоящему изобретению содержит первую, вторую и третью полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер1-CH2-CH3,

ii) вторая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CD3)-линкер3-VL(CD3)-линкер4-CH2-CH3 или VL(CD3)-линкер3-VH(CD3)-линкер4-CH2-CH3, и

iii) третья полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VL(CLDN18.2)-CL,

при этом линкер1 включает аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP или ее функциональный вариант, линкер3 включает аминокислотную последовательность (GKPGS)_x или ее функциональный вариант, где x

равно 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно, где x равно 4, и линкер₄ включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из EPKSCDKTHTCPPCP, EPKSSDKTHTCPPCP и (G4S)₂KTHTCPPCP или их функционального варианта, и

предпочтительно где VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, и VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CD3.

В другом воплощении связывающий агент по изобретению содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер-CH2-CH₃,

ii) вторая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер-VH(CD3)-линкер-VL(CD3)-линкер-CH2-CH₃ или VH(CLDN18.2)-CH1-линкер-VL(CD3)-линкер-VH(CD3)-линкер-CH2-CH₃,

iii) третья полипептидная цепь содержит от N-конца до C-конца следующие домены:

VL(CLDN18.2)-CL, и

iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи,

предпочтительно, где VH(CLDN18.2) на первой полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на третьей полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, VH(CLDN18.2) на второй полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на четвертой полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена, специфичного к CLDN18.2, а VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена, специфичного к CD3.

В другом воплощении связывающий агент по изобретению содержит первую, вторую, третью и четвертую полипептидную цепь, где

i) первая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер₁-CH2-CH₃,

ii) вторая полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VH(CLDN18.2)-CH1-линкер₂-VH(CD3)-линкер₃-VL(CD3)-линкер₄-CH2-CH₃ или VH(CLDN18.2)-CH1-линкер₂-VL(CD3)-линкер₃-VH(CD3)-линкер₄-CH2-CH₃,

iii) третья полипептидная цепь включает от N-конца до C-конца:

VL(CLDN18.2)-CL, и

iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи, при этом линкер1 включает аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP или ее функциональный вариант, линкер2 включает аминокислотную последовательность (G4S) x или ее функциональный вариант, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно, где x равно 2, линкер3 включает аминокислотную последовательность (GKPGS) x или ее функциональный вариант, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно, где x равно 4, и линкер 4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из EPKSCDKTHTCPPCP, EPKSSDKTHTCPPCP и (G4S)2KTHTCPPCP или их функционального варианта, и

предпочтительно, где VH(CLDN18.2) на первой полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на третьей полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, VH(CLDN18.2) на второй полипептидной цепи и VL(CLDN18.2) на четвертой полипептидной цепи взаимодействуют с образованием связывающего домена, специфичного к CLDN18.2, а VH(CD3) и VL(CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена, специфичного к CD3.

Связывающие агенты, описанные в настоящей заявке, и/или первая, вторая и третья (и необязательно четвертая) полипептидные цепи указанных связывающих агентов, описанных в настоящей заявке, также могут содержать аминокислотную последовательность для облегчения секреции связывающего агента или полипептидную цепь, такую как N-концевой сигнал секреции и/или одну или несколько эпитопных меток, облегчающих связывание, очистку или обнаружение молекулы. Предпочтительно сигнал секреции представляет собой сигнальную последовательность (например, аминокислотную последовательность MGWSCILFLVATATGVHS), которая обеспечивает достаточный проход по секреторному пути и/или секрецию связывающего агента или его полипептидных цепей во внеклеточную среду. Предпочтительно, чтобы сигнальная последовательность секреции была расщепляемой и удалялась из зрелого связывающего агента или полипептидной цепи. Сигнальную последовательность секреции предпочтительно выбирают в зависимости от клетки или организма, в которых продуцируется связывающий агент или полипептидная цепь.

Аминокислотная последовательность эпитопной метки может быть введена в любое положение аминокислотной последовательности связывающего агента или полипептидной цепи и может иметь форму петли внутри кодируемой белковой структуры, или она может объединена путем слияния на N-конце или C-конце со связывающим агентом или полипептидной цепью. Предпочтительно эпитопная метка слита на C-конце

со связывающим агентом или полипептидной цепью. Эпитопная метка может содержать сайт расщепления, который позволяет удалить метку из связывающего агента или полипептидной цепи. Указанная эпитопная метка может представлять собой эпитопную метку любого типа, которая функциональна в нативных и/или денатурирующих условиях, предпочтительно гистидиновую метку, наиболее предпочтительно метку, содержащую шесть гистидинов.

Связывающий агент по изобретению может содержать, помимо указанных первого, второго и, необязательно, третьего связывающих доменов, один или несколько дополнительных связывающих доменов, которые служат, например, для повышения селективности в отношении опухолевых клеток. Этого можно достичь, например, путем предоставления связывающих доменов, которые связываются с другими антигенами, экспрессируемыми на опухолевых клетках.

Термин «посттрансляционная модификация» или подобные термины относятся к модификациям белка, таким как ковалентные и ферментативные модификации, которые происходят после биосинтеза белка. Как общеизвестно в данной области техники, связывающие агенты, такие как антитела, которые экспрессируются в клетках, часто модифицируются после трансляции. Например, посттрансляционные модификации связывающих агентов, таких как антитела, могут происходить на боковых цепях аминокислот или на N- или C-концах тяжелых или легких цепей, например, первой и/или второй полипептидной цепи, описанной в настоящей заявке. Примеры посттрансляционных модификаций, которые могут происходить в связывающих агентах, описанных в настоящей заявке, включают, без ограничения указанным, отщепление лизина на C-конце тяжелой цепи, например, первой и/или второй полипептидной цепи, например, карбоксипептидазой; модификация глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи, например, первой и/или второй полипептидной цепи, в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования; модификация глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце легкой цепи, например, третьей и/или четвертой полипептидной цепи, в пироглутаминовую кислоту путем пироглутамилирования; гликозилирование; окисление; дезамидирование; и гликирование. Известно, что подобные посттрансляционные модификации происходят в различных связывающих агентах (Liu et al., 2008, J. Pharmacol. Sci. 97(7):2426-2447). Посттрансляционные модификации за счет пироглутамилирования на N-конце и делеции лизина на C-конце обычно не оказывают влияния на активность связывающих агентов (Lyubarskaya et al., 2006, Analyt. Biochem. 348(1):24-39).

Таким образом, в одном воплощении описанный в данной заявке связывающий агент может содержать одну или несколько посттрансляционных модификаций. В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций включают пироглутамилирование на N-конце одной или нескольких полипептидных цепей связывающего агента. В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций включают пироглутамилирование на N-конце одного или нескольких VH (CLDN18.2). В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций включают пироглутамилирование на N-конце VH(CD3). В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций включают делецию лизина на C-конце первой полипептидной цепи. В одном воплощении одна или несколько посттрансляционных модификаций включают делецию лизина на C-конце второй полипептидной цепи.

В контексте настоящего изобретения полученные связывающие агенты предпочтительно способны вызывать одну или несколько иммунных эффекторных функций, как описано в данной заявке. Предпочтительно, чтобы указанные иммунные эффекторные функции были направлены против клеток, несущих на своей поверхности антиген CLDN18.2, ассоциированный со злокачественной опухолью.

Термин «иммунные эффекторные функции» в контексте настоящего изобретения включает любые функции, опосредованные компонентами иммунной системы, которые в результате дают, например, ингибирование роста рака и/или ингибирование развития рака, включая ингибирование распространения рака и метастазирования. Предпочтительно, иммунные эффекторные функции приводят к уничтожению клеток рака. Иммунные эффекторные функции включают зависимую от комплемента цитотоксичность (КЗЦ), антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), индукцию апоптоза в клетках, несущих антиген, ассоциированный с раком, цитолиз клеток, несущих антиген, ассоциированный с раком, и/или ингибирование пролиферации клеток, несущих антиген, ассоциированный с раком. Связывающие агенты, описанные в настоящей заявке, предпочтительно способны рекрутировать и перенаправлять Т-клетки, такие как CD4 и/или CD8 Т-клетки, в частности CD107a⁺ Т-клетки, на ассоциированные с заболеванием клетки, такие как раковые клетки, и, таким образом, действовать посредством перенаправленной цитотоксичности Т-клеток (RTCC), т.е. Т-клетки при перенаправлении предпочтительно убивают клетки, ассоциированные с заболеванием, например, раковые клетки. Известно, что экспрессия CD107a связана с цитолитическим потенциалом CD4 Т-клеток и CD8 Т-клеток. Предпочтительно, указанные CD107a⁺ Т-клетки способны к

дегрануляции, т.е. они способны высвобождать цитотоксические молекулы, такие как перфорины, гранзимы и т.д., а также могут высвобождать цитокины, такие как один или несколько из числа фактора некроза опухоли α (TNF α), интерлейкина-2 (IL2), интерферона γ (IFN γ) и т.д., тем самым вызывая гибель клеток-мишеней, например, раковых клеток, на которые Т-клетки перенаправляются связывающими агентами настоящего изобретения. Связывающие агенты также могут оказывать эффект просто путем связывания с антигенами, ассоциированными с раком, на поверхности раковых клеток. Например, связывающие агенты могут блокировать функцию антигена, ассоциированного с раком, или индуцировать апоптоз просто путем связывания с антигеном, ассоциированным с раком, на поверхности раковых клеток.

Термин «иммунная эффекторная клетка» или «эффекторная клетка» в контексте настоящего изобретения относится к клетке, которая осуществляет эффекторные функции во время иммунной реакции. Например, иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки (цитотоксические Т-клетки, Т-хелперы, инфильтрирующие опухоль Т-клетки), В-клетки, естественные клетки-киллеры, нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки. Термины «Т-клетка» и «Т-лимфоцит» используются взаимозаменяемо в данной заявке и включают Т-хелперные клетки (CD4⁺ Т-клетки) и цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ, CD8⁺ Т-клетки), которые включают цитолитические Т-клетки. Термин «МНС-зависимая Т-клетка» или подобные термины относятся к Т-клетке, которая распознает антиген, когда он представлен в контексте МНС, и предпочтительно осуществляет эффекторные функции Т-клеток, например, уничтожая клетки-мишени, экспрессирующие антиген.

Т-клетки принадлежат к группе белых кровяных клеток, известных как лимфоциты, и играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Они могут отличаться от другого типа лимфоцитов, таких как В-клетки и природные киллерные клетки присутствием специального рецептора на их клеточной поверхности, который называется Т-клеточный рецептор (TCR). Тимус является основным органом, отвечающим за созревание Т-клеток. Было обнаружено несколько различных подгрупп Т-клеток, причем каждая имеет отличную от других функцию.

Т-хелперные клетки помогают другим белым кровяным клеткам в иммунологическом процессе, включая среди прочих функций созревание В-клеток в плазматические клетки и активацию цитотоксических Т-клеток и макрофагов. Эти клетки также известны как CD4⁺ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD4 на своей поверхности. Т-хелперы обычно активируются, когда им презентуются пептидные антигены с помощью молекул МНС класса II, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). После активации они быстро делятся

и секретируют небольшие белки, называемые цитокинами, которые регулируют активный иммунный ответ или способствуют активному иммунному ответу.

Цитотоксические Т-клетки разрушают инфицированные вирусом клетки и раковые клетки, а также участвуют в отторжении трансплантата. Эти клетки также известны как CD8⁺ Т-клетки, поскольку они экспрессируют гликопротеин CD8 на своей поверхности. Эти клетки обычно распознают свои мишени путем связывания с антигеном, связанным с МНС класса I, который присутствует на поверхности почти каждой клетки организма.

Все Т-клетки имеют Т-клеточный рецептор (TCR), существующий в виде комплекса нескольких белков. TCR Т-клетки способен взаимодействовать с иммуногенными пептидами (эпитопами), связанными с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и представленными на поверхности клеток-мишеней. Специфичное связывание TCR передает каскад сигналов внутрь Т-клетки, приводя к пролиферации и дифференцировке в зрелую эффекторную Т-клетку. В большинстве Т-клеток настоящий рецептор Т-клеток состоит из двух отдельных пептидных цепей, которые производятся из независимых генов альфа- и бета-рецепторов Т-клеток (TCR α и TCR β) и называются цепями α - и β -TCR. Гораздо менее распространенная (2% от общего числа Т-клеток) группа Т-клеток, $\gamma\delta$ -Т-клетки (гамма-дельта-Т-клетки) обладают отдельным рецептором Т-клеток (TCR) на своей поверхности, который состоит из одной γ -цепи и одной δ -цепи.

Все Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Гематопоэтические предшественники, происходящие из гемопоэтических стволовых клеток, заселяют тимус и размножаются за счет клеточного деления, образуя большую популяцию незрелых тимоцитов. Самые ранние тимоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8 и поэтому классифицируются как дважды негативные (CD4-CD8-) клетки. По мере своего развития они становятся дважды положительными тимоцитами (CD4⁺CD8⁺) и, наконец, созревают до одиночных положительных (CD4⁺CD8- или CD4-CD8⁺) тимоцитов, которые затем высвобождаются из тимуса в периферические ткани.

Используемый в данной заявке термин «NK-клетка» или «естественная клетка-киллер» относится к субпопуляции лимфоцитов периферической крови, определяемой по экспрессии CD56 или CD16 и отсутствию Т-клеточного рецептора.

Молекулы МНС у людей обычно называют молекулами HLA (человеческий лейкоцитарный антиген). Существует два основных класса молекул МНС: класс I и класс II. Антигены МНС класса I обнаруживаются почти во всех ядросодержащих клетках организма. Основная функция этого класса молекул МНС заключается в отображении (или презентации) пептидных фрагментов внутриклеточных белков ЦТЛ. Основываясь на

этом отображении, ЦТЛ будут атаковать тех, кто отображает пептиды, связанные с МНС, включая пептиды, связанные с заболеваниями (антигены), такие как антигены рака. CD8-положительные Т-клетки обычно цитотоксичны (поэтому их называют цитотоксическими Т-клетками = ЦТЛ), распознают пептиды из 9-10 аминокислот, которые внутриклеточно процессируются из белков любой субклеточной локализации и которые представлены на клеточной поверхности молекулами МНС класса I. Таким образом, поверхностная экспрессия молекул МНС класса I играет решающую роль в определении чувствительности клеток-мишеней к ЦТЛ.

Описанные в данной заявке связывающие агенты могут быть конъюгированы с терапевтической группировкой или агентом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиоизотоп. Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который вреден для клеток и, в частности, убивает их. Примеры включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, а также пуромицин и их аналоги или гомологи. Подходящие терапевтические агенты для образования конъюгатов включают, без ограничения указанным, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлоретамин, тиоепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфат, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС), а также антимитотические агенты (например, винкристин и винбластин). В предпочтительном воплощении терапевтический агент представляет собой цитотоксический агент или радиотоксический агент. В другом воплощении терапевтический агент представляет собой иммуносупрессант. В еще одном воплощении терапевтический агент представляет собой GM-CSF. В предпочтительном воплощении терапевтический агент представляет собой доксорубин, цисплатин, блеомицин, сульфат, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид или ризин А.

Связывающие агенты также могут быть конъюгированы с радиоизотопом, например, йодом-131, иттрием-90 или индием-111, для получения цитотоксических радиофармацевтических препаратов.

Методы конъюгации такой терапевтической группировки со связывающими агентами хорошо известны, см., например, Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», в Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery», in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Термин «связывание» по изобретению предпочтительно относится к специфическому связыванию.

Согласно настоящему изобретению антитело способно связываться с заранее определенной мишенью, если оно обладает значительной аффинностью к указанной заранее определенной мишени и связывается с указанной заранее определенной мишенью в стандартных анализах. «Аффинность» или «аффинность связывания» часто измеряют равновесной константой диссоциации (KD). Предпочтительно термин «существенная аффинность» относится к связыванию с заранее определенной мишенью с константой диссоциации (KD) 10^{-5} М или ниже, 10^{-6} М или ниже, 10^{-7} М или ниже, 10^{-8} М или ниже, 10^{-9} М или ниже, 10^{-10} М или ниже, 10^{-11} М или ниже или 10^{-12} М или ниже.

Агент не способен (по существу) связываться с мишенью, если агент не имеет существенной аффинности к указанной мишени и не связывается в значительной степени, в частности, не связывается детектируемым образом, с указанной мишенью в стандартных анализах. Предпочтительно, чтобы агент не связывался детектируемым образом с указанной мишенью, когда он присутствует в концентрации до 2, предпочтительно 10, более предпочтительно 20, в частности 50 или 100 мкг/мл или выше. Предпочтительно, чтобы агент не имел существенной аффинности к мишени, когда агент связывается с указанной мишенью с KD, которая по меньшей мере в 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 или 10^6 раз выше, чем KD для связывания с заранее определенной мишенью, с которой агент способен связываться. Например, если KD связывания агента с мишенью, с которой агент способен связываться, составляет 10^{-7} М, KD связывания с мишенью, к которой агент не имеет существенной аффинности, будет составлять по меньшей мере 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Связывающий агент, такой как антитело, специфичен в отношении заранее определенной мишени, если он способен связываться с указанной заранее определенной мишенью, но не способен связываться с другими мишенями, т.е. не имеет существенной аффинности к другим мишеням и не связывается в значительной степени с другими мишенями в стандартных анализах. Согласно изобретению связывающий агент специфичен к CLDN18.2, если агент способен связываться с CLDN18.2, но не способен (по существу) связываться с другими мишенями. Предпочтительно, связывающий агент является специфичным к CLDN18.2, если аффинность и связывание с такими другими мишенями существенно не превышают аффинность или связывание с белками, неродственными CLDN18.2, такими как бычий сывороточный альбумин (BSA), казеин, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или трансмембранные белки, не являющиеся клаудином, такие как молекулы МНС или рецептор трансферрина, или любой другой указанный полипептид. Предпочтительно, связывающий агент является специфичным в отношении заранее определенной мишени, если агент связывается с указанной мишенью с KD , которая по меньшей мере в 10 , 100 , 10^3 , 10^4 , 10^5 или 10^6 раз ниже, чем KD для связывания с мишенью, к которой агент не специфичен. Например, если KD связывания связывающего агента с мишенью, к которой он специфичен, составляет 10^{-7} М, KD связывания с мишенью, к которой он не специфичен, будет составлять не менее 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М или 10^{-1} М.

Термин « k_d » (сек-1), используемый в данной заявке, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называется значением k_{off} .

Используемый в данной заявке термин « KD » (М) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Связывание связывающего агента с мишенью можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа; см., например, Berzofsky et al., «Antibody-Antigen Interactions» In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), и способы, описанные в данной заявке. Аффинности можно легко определить с использованием обычных методов, таких как равновесный диализ; с помощью прибора ВІАcore 2000, используя общие процедуры, указанные производителем; радиоиммуноанализ с использованием радиоактивно меченного антигена-мишени; или другой способ, известный специалисту в данной области. Данные об аффинности можно анализировать, например, способом Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949). Измеренная аффинность конкретного взаимодействия между связывающим агентом и

антигеном может варьироваться, если ее измерять в разных условиях, например, в части концентрации соли, pH. Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания с антигеном, например, KD, IC50, предпочтительно проводят с использованием стандартизированных растворов связывающего агента и антигена и стандартизированного буфера.

Термин «конкурирует» относится к конкуренции между двумя связывающими агентами, такими как антитела, за связывание с целевым антигеном. Если два связывающих агента не блокируют друг друга при связывании с целевым антигеном, такие связывающие агенты не конкурируют, и это указывает на то, что указанные связывающие агенты не связываются с одной и той же частью, т.е. с эпитопом целевого антигена. Специалисту в данной области хорошо известно, как проверить способность связывающих агентов конкурировать за связывание с целевым антигеном. Примером такого способа является так называемый анализ перекрестного конкурентного связывания, который может, например, проводиться с помощью ELISA или с помощью проточной цитометрией.

Например, анализ на основе ELISA можно проводить путем покрытия лунок планшета ELISA каждым из связывающих агентов; добавления конкурирующего связывающего агента и His-меченного внеклеточного домена антигена/мишени и инкубирования; причем определение того, ингибирует ли добавленный связывающий агент связывание белка, меченного His, с покрытым связывающим агентом, может быть выполнено путем добавления биотинилированного анти-His антитела с последующим добавлением стрептавидин-поли-HRP и дальнейшего реагирования с ABTS и измерения оптической плотности при 405 нм. Например, анализ проточной цитометрии может быть выполнен путем инкубации клеток, экспрессирующих антиген/мишень, с избытком немеченого связывающего агента, инкубации клеток с субоптимальной концентрацией меченного биотином антитела с последующими инкубацией с флуоресцентно меченым стрептавидином и анализом проточной цитометрией.

Два связывающих агента, такие как антитела, имеют «одинаковую специфичность», если они связываются с одним и тем же антигеном и одним и тем же эпитопом. Такие связывающие агенты будут конкурировать за связывание в анализе конкурентного связывания. В одном воплощении считается, что связывающие агенты, связывающиеся с одним и тем же эпитопом, связываются с одними и теми же аминокислотами в молекуле-мишени. То, что антитела связываются с одним и тем же эпитопом на целевом антигене, может быть определено с помощью стандартных

экспериментов по аланиновому сканированию или экспериментов по кристаллизации антитело-антиген, известных специалисту в данной области.

Способность связывающих агентов конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти связывающие агенты могут связываться с одной и той же эпитопной областью антигена или при связывании с другим эпитопом стерически препятствовать связыванию связывающих агентов с этой конкретной эпитопной областью. Конкурирующие связывающие агенты можно легко идентифицировать на основе их способности конкурировать с одним или несколькими связывающими агентами в стандартных анализах связывания, таких как анализ поверхностного плазмонного резонанса, анализы ELISA или проточная цитометрия (см. WO 2013/173223). Например, конкуренцию между связывающими агентами можно обнаружить с помощью анализа перекрестного блокирования. Например, конкурентный анализ ELISA можно провести путем нанесения целевого антигена на лунки микротитровального планшета и добавления антигенсвязывающего агента и потенциального конкурирующего тестируемого связывающего агента. Количество антигенсвязывающего агента, связанного с антигеном в лунке, косвенно коррелирует со способностью связывания кандидата, конкурирующего с тестируемым связывающим агентом, который конкурирует с ним за связывание, например, с тем же эпитопом. В частности, чем выше аффинность кандидата, конкурирующего с тестируемым связывающим агентом за один и тот же эпитоп, тем меньше количество антигенсвязывающего агента, связанного с лункой, покрытой антигеном. Количество антигенсвязывающего агента, связанного с лункой, можно измерить путем мечения связывающего агента детектируемыми или измеримыми мечеными веществами. Как описано в WO 2013/173223 и известно в данной области техники, анализ поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием прибора Biacore, может быть использован для идентификации перекрывающихся и различающихся эпитопных областей, распознаваемых связывающими агентами. Альтернативно, конкуренцию можно определить с помощью биослойной интерферометрии.

Связывающий агент, конкурирующий за связывание с антигеном с другим связывающим агентом, например, связывающим агентом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано в настоящей заявке, или связывающим агентом, имеющим специфичность к антигену другого связывающего агента, например, связывающего агента, содержащего переменные области тяжелой и/или легкой цепи, как описано в настоящей заявке, такой как антитело, может представлять собой связывающий агент, содержащий варианты указанных переменных областей тяжелой и/или легкой

цепи, как описано в настоящей заявке, например, модификации CDR и/или определенную степень идентичности, как описано в настоящей заявке.

Используемый в данной заявке термин «изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Используемый в данной заявке термин «переключение изотипа» относится к явлению, посредством которого класс или изотип антитела изменяется с одного класса Ig на один из других классов Ig.

Термин «встречающийся в природе», используемый в данной заявке применительно к объекту, относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

Термин «перегруппированный», используемый в настоящей заявке, относится к конфигурации локуса тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, в которой сегмент V расположен непосредственно рядом с сегментом D-J или J в конформации, кодирующей по существу полный домен VH или VL, соответственно. Перегруппированный локус гена иммуноглобулина (антитела) можно идентифицировать путем сравнения с ДНК зародышевой линии; перегруппированный локус будет иметь по меньшей мере один рекомбинированный с помощью гомологии гептамера/нонамера элемент.

Термин «неперегруппированный» или «конфигурация зародышевой линии», используемый в данной заявке в отношении V-сегмента, относится к конфигурации, в которой V-сегмент не рекомбинирован так, чтобы оказаться в непосредственно смежной позиции по отношению к D- или J-сегменту.

В одном воплощении связывающий агент по изобретению обладает способностью связываться с CLDN18.2, т.е. способностью связываться и предпочтительно связываться с эпитопом, присутствующим в CLDN18.2, предпочтительно с эпитопом, расположенным внутри внеклеточных доменов CLDN18.2, в частности, первой внеклеточной петлей, предпочтительно аминокислотными положениями 29-78 в CLDN18.2. В конкретных воплощениях агент, обладающий способностью связываться с CLDN18.2, связывается с эпитопом CLDN18.2, который отсутствует на CLDN18.1.

Агент, обладающий способностью связываться с CLDN18.2, предпочтительно связывается с CLDN18.2, предпочтительно человека, мыши и/или яванского макака, но не с CLDN18.1, предпочтительно человека, мыши и/или яванского макака. Предпочтительно,

чтобы агент, связывающийся с CLDN18.2, не связывался с CLDN9, предпочтительно человека, мыши и/или яванского макака. Предпочтительно, чтобы агент, обладающий способностью связываться с CLDN18.2, был специфичен к CLDN18.2. Предпочтительно, чтобы агент, обладающий способностью связываться с CLDN18.2, связывался с CLDN18.2, экспрессируемым на поверхности клетки. В особенно предпочтительных воплощениях агент, обладающий способностью связываться с CLDN18.2, связывается с нативными эпитопами CLDN18.2, присутствующими на поверхности живых клеток.

Термин «фрагмент» относится, в частности, к одной или нескольким определяющим комплементарность областям (CDR), предпочтительно, по меньшей мере, к вариабельной области CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной области легкой цепи (VL). В одном воплощении указанная одна или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), выбраны из набора областей, определяющих комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3. В особенно предпочтительном воплощении термин «фрагмент» относится к определяющим комплементарность областям CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной области легкой цепи (VL).

В одном воплощении связывающий домен, содержащий один или несколько CDR, набор CDR или комбинацию наборов CDR, как описано в настоящей заявке, содержит указанные CDR вместе с промежуточными каркасными областями. Предпочтительно часть также будет включать по меньшей мере около 50% одного или обоих из первого и четвертого каркасных участков, причем 50% составляют С-концевые 50% первой каркасной области и N-концевые 50% четвертой каркасной области. Конструирование связывающих агентов, полученных методами рекомбинантной ДНК, может привести к введению N- или С-концевых остатков в вариабельные области, кодируемые линкерами, введенными для облегчения клонирования или других стадий манипуляции, включая введение линкеров для соединения вариабельных областей по изобретению к дальнейшим белковым последовательностям, включая тяжелые цепи иммуноглобулина, другие вариабельные области или белковые метки.

В одном воплощении связывающий домен, содержащий один или несколько CDR, набор CDR или комбинацию наборов CDR, как описано в настоящей заявке, содержит указанные CDR в каркасе человеческого антитела.

Точная идентификация областей CDR зависит от способа расчета, используемого для определения участвующих аминокислотных остатков. Например, по данным Kabat et al. (см. выше), вариабельные области обычно включают аминокислотные остатки 24-34 (CDR1), 50-56 (CDR2) и 89-97 (CDR3) в VL и приблизительно кругом около 31-35 (CDR1),

50-65 (CDR2) и 95-102 (CDR3) в VH; вариабельные области могут также включать остатки, образующие гипервариабельную петлю (например, остатки 26-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 91-96 (CDR3) в VL и 26-32 (CDR1), 53-55 (CDR2) и 96-101 (CDR3) в VH (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917)).

Специалист в данной области техники поймет, что точная идентификация положений CDR в последовательностях, раскрытых в настоящей заявке, может немного отличаться в зависимости от используемой системы нумерации, как показано в таблице 1 ниже (см. Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

Таблица 1

	Kabat + Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Контакт
VH: CDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
VH: CDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
VH: CDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
VL: CDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
VL: CDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
VL: CDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

Таким образом, последовательности CDR, раскрытые в настоящей заявке, также содержат их варианты, полученные в соответствии с различными системами нумерации. Соответственно, раскрытие каждого VH представляет собой раскрытие CDR (например, CDR1, CDR2 и CDR3), полученных из него, а раскрытие каждого VL представляет собой раскрытие CDR (например, CDR1, CDR2 и CDR3), полученных из него.

В настоящем описании система нумерации по Kabat используется при ссылке на остатки в вариабельных областях (приблизительно остатки 1–107 легкой цепи и остатки 1–113 тяжелой цепи) связывающих доменов со специфичностью к CD3 или CLDN18.2. и систему нумерации EU для областей CH1 и CH2-CH3 (необязательно включая шарнир), как описано в настоящей заявке.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению содержит VH, содержащий определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 39 и 40. Более предпочтительно, связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению содержит VH, содержащий определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению содержит VL, содержащую

определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в пределах аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41 и 42. Более предпочтительно, связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению содержит VL, содержащую определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42.

В предпочтительном воплощении связывающий домен связывающего агента по настоящему изобретению со специфичностью к CLDN18.2 содержит следующий набор CDR:

VH включает CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, или ее функциональный вариант, а

VL включает CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, или ее функциональный вариант.

В одном воплощении VH дополнительно включает CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32 или ее функциональный вариант, и/или CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33 или ее функциональный вариант, и/или VL дополнительно включает CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35 или ее функциональный вариант, и/или CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36 или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен связывающего агента по настоящему изобретению со специфичностью к CLDN18.2 содержит следующий набор CDR:

VH включает CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, или ее функциональный вариант, а VL включает CDR1, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, или ее функциональный вариант. Предпочтительно, VH включает CDR1, 2 и 3 из SEQ ID NO: 32, 33 и 34, а VL включает CDR1, 2 и 3 из SEQ ID NO: 35, 36 и 37.

В одном воплощении указанные переменные области тяжелой и легкой цепей содержат указанные области, определяющие комплементарность, внедренные в каркасные области. В одном воплощении каждая переменная область содержит три области, определяющие комплементарность (CDR1, 2 и 3) и четыре каркасных области (FR1, 2, 3 и 4). В одном воплощении указанные области, определяющие комплементарность, и указанные каркасные области расположены от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по настоящему изобретению содержит VH(CLDN18.2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 39, 40 или его функциональный вариант, предпочтительно аминокислотные последовательности, представленные SEQ ID NO: 39, или его функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению включает VL(CLDN18.2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41, 42 или ее функционального варианта, предпочтительно аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 42 или ее функциональный вариант.

В одном воплощении связывающий домен связывающего агента по настоящему изобретению со специфичностью к CLDN18.2 включает следующую комбинацию VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2):

VH(CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 38 или ее функциональный вариант, а VL (CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 41 или ее функциональный вариант.

В одном воплощении связывающий домен связывающего агента по настоящему изобретению со специфичностью к CLDN18.2 содержит следующую комбинацию VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2):

VH(CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 40 или ее функциональный вариант, а VL(CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 42 или ее функциональный вариант.

В особенно предпочтительном воплощении связывающий домен, специфичный к CLDN18.2, связывающего агента по настоящему изобретению включает следующую комбинацию VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2):

VH(CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 39 или ее функциональный вариант, а VL(CLDN18.2) включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 42 или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении каркасные области доменов VH и VL, присутствующие в связывающем агенте по изобретению, могут содержать аминокислотные замены, но сохранять по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека.

В дополнительных воплощениях связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 связывающего агента по изобретению содержит переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, которое (i) конкурирует за связывание CLDN18.2 с антителом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано выше, и/или (ii) обладает специфичностью к CLDN18.2 антитела, содержащего переменные области тяжелой и легкой цепи, как описано выше.

В одном воплощении связывающий домен связывающего агента по настоящему изобретению со специфичностью к CLDN18.2 имеет формат молекулы Fab, как описано в настоящей заявке. В этом воплощении VH(CLDN18.2) является частью одной полипептидной цепи, такой как первая полипептидная цепь, а VL(CLDN18.2) является частью другой полипептидной цепи, такой как третья полипептидная цепь связывающего агента по изобретению. В одном воплощении VH(CLDN18.2) является частью первой и второй полипептидных цепей, как описано в настоящей заявке, а VL(CLDN18.2) является частью третьей полипептидной цепи и четвертой полипептидной цепи, идентичной третьей полипептидной цепи связывающего агента по изобретению.

Следует понимать, что связывающиеся с CLDN18.2 домены связывающего агента по изобретению в формате Fab2-scFv могут быть идентичными или по существу идентичными или разными и, таким образом, могут связываться с идентичными или по существу идентичными эпитопами или разными эпитопами CLDN18.2. Таким образом, оба связывающих домена, связывающиеся с CLDN18.2 связывающего агента по изобретению в формате Fab2-scFv, могут соответствовать или по существу соответствовать одному из связывающих доменов, связывающихся с CLDN18.2, описанным в настоящей заявке, или они могут быть независимо выбраны из связывающих доменов, связывающиеся с CLDN18.2, описанных в данной заявке.

В общем, любой домен, связывающий CD3, или его фрагменты, известные в данной области техники, можно использовать в связывающих агентах по изобретению, таких как домен, связывающий CD3, из анти-CD3-антитела. Анти-CD3-антитела, которые

можно использовать для получения связывающих агентов по изобретению, включают, без ограничения указанным, UCHT1-HS (гуманизированное мАт), UCHT1-MM (мышинное мАт), CLB-T3, TR66, 145-2C11.

UCHT1 представляет собой моноклональное IgG1 анти-CD3 антитело, которое детектирует CD3 в образцах человека и приматов. CLB-T3 представляет собой мышинное моноклональное анти-CD3 антитело, которое направлено против антигена CD3 и реагирует с 80–90% периферических Т-лимфоцитов человека и медуллярных тимоцитов. TR66 представляет собой мышинное моноклональное IgG1 анти-CD3 антитело, которое распознает эpsilon-цепь CD3 человека. 145-2C11 представляет собой моноклональное армянского хомяка антитело против CD3 мыши.

Предпочтительно, домены VH и VL связывающего домена со специфичностью к CD3 происходят из антител/молекул антител и антителоподобных молекул, которые способны специфически распознавать CD3 человека в контексте других субъединиц TCR, присутствующих на активированных первичных Т-клетках человека, экспрессирующих TCR в его собственной конфигурации. Домены VH и VL, полученные из антитела, специфичного к эpsilon-цепи CD3, являются наиболее предпочтительными, и указанные (родительские) антитела должны быть способны специфически связывать эпитопы, отражающие нативную или почти нативную структуру или конформационный эпитоп CD3 человека, представленный в контексте комплекса TCR. В одном воплощении изобретения домены VH и VL связывающего домена со специфичностью к CD3 получены из CD3-специфического антитела, выбранного из группы, состоящей из UCHT1-HS, UCHT1-MM, CLB-T3 и TR66.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по изобретению содержит VH, содержащий CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58, 61, 64, 67 и 70.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по настоящему изобретению содержит VH, содержащий набор CDR1, CDR2 и CDR3, выбранный из следующих воплощений (i)-(vi):

- (i) CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант,
- (ii) CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 50 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант,
- (iii) CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 51 или ее функциональный вариант,

(iv) CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 52 или ее функциональный вариант,

(v) CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 53 или ее функциональный вариант,
и

(vi) CDR1: SEQ ID NO: 49 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по изобретению содержит VL, содержащую CDR1, CDR2 и/или CDR3, идентифицированные в аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по настоящему изобретению содержит VL, включающую следующий набор CDR1, CDR2 и CDR3:

CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по настоящему изобретению содержит комбинацию VH и VL, каждый из которых содержит набор CDR1, CDR2 и CDR3, выбранных из следующих воплощений (i)-(vi):

(i) VH: CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант,

(ii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 50 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант,

(iii) VH: CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 51 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант,

(iv) VH: CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 52 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант,

(v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 43 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 53 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант, и

(v) VH: CDR1: SEQ ID NO: 49 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 44 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 45 или ее функциональный вариант, VL: CDR1: SEQ ID NO: 46 или ее функциональный вариант, CDR2: SEQ ID NO: 47 или ее функциональный вариант, CDR3: SEQ ID NO: 48 или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 содержит VH и VL, выбранные из следующих воплощений (i)-(vi):

(i) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 54 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта,

(ii) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта,

(iii) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 61 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта,

(iv) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 64 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта,

(v) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 67 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из

аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта, и

(v) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 70 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта.

В одном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56, 57, 59, 60, 62, 63, 65, 66, 68, 69, 71 и 72 или их функционального варианта. Конечно, линкеры scFv, содержащиеся в указанных последовательностях, могут быть заменены любым другим линкером scFv, таким как линкер scFv, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-20 или их функционального варианта.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 и 61 или их функционального варианта.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий домен со специфичностью к CD3 связывающего агента по настоящему изобретению содержит VH и VL, выбранные из следующих воплощений (i)-(iii):

(i) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 54 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта,

(ii) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 58 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта, и

(iii) VH включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 61 или ее функционального варианта, а VL включает или состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 55 или ее функционального варианта.

В некоторых воплощениях связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CD3, связывается с CD3 с высокой аффинностью, т.е. является сильным связующим CD3 (например, связывающие агенты, содержащие SEQ ID NO: 56 или 57; или SEQ ID NO: 54, или CDR1, 2 и 3 идентифицированные в нем, и 55, или CDR1, 2 и 3, идентифицированные в нем). В некоторых воплощениях связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CD3, связывается со средней аффинностью с CD3, т.е. является средним связующим CD3. В некоторых воплощениях связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CD3, связывается с CD3 с низкой аффинностью, т.е. является слабым связующим CD3. В некоторых воплощениях более высокая аффинность связывания с CD3 усиливает RTCC. В одном воплощении двухвалентное связывание с CLDN18.2 усиливает RTCC по сравнению с моновалентным связыванием.

В некоторых воплощениях одна или несколько полипептидных цепей связывающего агента по изобретению содержат CH1, как описано в настоящей заявке. В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению содержит CH1. В другом предпочтительном воплощении первая и вторая полипептидные цепи связывающего агента по изобретению содержат CH1. Предпочтительно, CH1 первой и/или второй полипептидной цепи связывающего агента по изобретению происходит из IgG, предпочтительно IgG1, более предпочтительно IgG1 человека. В некоторых воплощениях одна или несколько полипептидных цепей связывающего агента по изобретению содержат домены CH2 и CH3. В предпочтительном воплощении первая и/или вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению содержат домены CH2 и CH3. Предпочтительно домены CH2 и CH3 первой и/или второй полипептидной цепи связывающего агента по изобретению происходят из IgG, предпочтительно IgG1, более предпочтительно IgG1 человека. В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, содержащая VH(CLDN18.2), содержит CH1, CH2 и CH3, а вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, содержащая VH(CD3) и VL(CD3) содержит CH2 и CH3, где указанные домены предпочтительно происходят из IgG, такого как IgG1, например, IgG1 человека. В другом предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, содержащая VH(CLDN18.2), содержит CH1, CH2 и CH3, а вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, содержащая VH(CLDN18.2), VH(CD3) и VL(CD3) содержат CH1, CH2 и CH3, где указанные домены предпочтительно происходят из IgG, такого как IgG1, например, IgG1 человека.

В некоторых воплощениях полипептидная цепь связывающего агента по изобретению, такая как третья и необязательно четвертая полипептидная цепь, содержащая VL(CLDN18.2), содержит CL, такой как CL, полученный из Igk или Igl, предпочтительно Igk, более предпочтительно Igk человека.

В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28, или ее функциональный вариант. В предпочтительном воплощении вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 29 или 30, или ее функциональный вариант. В предпочтительном воплощении третья и, необязательно, четвертая полипептидная цепь связывающего агента включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31, или ее функциональный вариант.

В предпочтительном воплощении связывающий агент по настоящему изобретению содержит первую, вторую, третью и, необязательно, четвертую полипептидные цепи, содержащие аминокислотные последовательности, выбранные из следующих воплощений:

(i) первая полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 28 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 29 или ее функциональный вариант, а третья полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 31 или ее функциональный вариант, или

(ii) первая полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 28 или ее функциональный вариант, вторая полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 30 или ее функциональный вариант, а третья полипептидная цепь содержит SEQ ID NO: 31 или ее функциональный вариант, или

при этом четвертая полипептидная цепь, если она присутствует, идентична третьей полипептидной цепи.

В предпочтительном воплощении связывающий агент по изобретению содержит по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CD3. В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 73, или ее функционального варианта. В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 75, или ее функционального варианта. В предпочтительном воплощении третья полипептидная цепь

связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта. В предпочтительном воплощении связывающий агент по изобретению, содержащий по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CD3, содержит набор из первой, второй и третьей полипептидных цепей SEQ ID NO: 73, 75 и 78 или их функционального варианта.

В другом предпочтительном воплощении связывание по изобретению включает по меньшей мере два связывающих домена со специфичностью к CLN18.2 и по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CD3. В предпочтительном воплощении первая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 73, или ее функционального варианта. В предпочтительном воплощении вторая полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, 76 и 77 или их функционального варианта. В предпочтительном воплощении третья полипептидная цепь связывающего агента по изобретению включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта. В предпочтительном воплощении связывающий агент по изобретению, содержащий по меньшей мере два связывающих домена, связывающихся с CLDN18.2, и по меньшей мере один связывающий домен со специфичностью к CD3, содержит набор из первой, второй, третьей и четвертой полипептидных цепей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: (i) 73, 74 и 78; (ii) 73, 76 и 78; (iii) 73, 77 и 78 или их функционального варианта, где четвертый связывающий домен идентичен третьему связывающему домену.

Следует понимать, что описанные в данной заявке связывающие агенты могут быть доставлены пациенту путем введения нуклеиновой кислоты, такой как РНК, кодирующей агент, и/или путем введения клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, такую как РНК, кодирующая агент. Если связывающий агент содержит более одной полипептидной цепи, разные полипептидные цепи могут кодироваться одной и той же нуклеиновой кислотой или разными нуклеиновыми кислотами, например, набором нуклеиновых кислот. Таким образом, нуклеиновая кислота, подлежащая введению, может представлять собой смесь различных молекул нуклеиновой кислоты, такую как набор нуклеиновых кислот. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот, кодирующих связывающий агент, например, при введении субъекту, такому как пациент, могут

присутствовать в чистой форме или в подходящем носителе доставки, например, в форме липосом или наночастиц или вирусных частиц, или внутри клетки-хозяина. Предлагаемая нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот могут продуцировать агент в течение продолжительных периодов времени устойчивым образом, смягчая нестабильность, по меньшей мере частично наблюдаемую для терапевтических антител. Нуклеиновые кислоты или наборы нуклеиновых кислот, предназначенные для доставки пациенту, могут быть получены рекомбинантными способами. Если нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот вводят пациенту, которые не присутствуют в клетке-хозяине, то эта нуклеиновая кислота предпочтительно поглощается клетками пациента для экспрессии связывающего агента, кодируемого нуклеиновой кислотой. Если нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот вводят пациенту, которые присутствуют в клетке-хозяине, то эта нуклеиновая кислота предпочтительно экспрессируется клеткой-хозяином внутри пациента, продуцируя связывающий агент, кодируемый нуклеиновой(ыми) кислотой(ами).

Термин «рекомбинантный» в контексте настоящего изобретения означает «сделанный с применением генетической инженерии». Предпочтительно, чтобы «рекомбинантный объект», такой как рекомбинантная нуклеиновая кислота в контексте настоящего изобретения, не встречается в природе.

Термин «природный» при использовании в данной заявке указывает на тот факт, что объект может быть обнаружен в естественной среде. Например, пептид или нуклеиновая кислота, которая присутствует в организме (включая вирусы) и может быть выделена из источника в естественной среде и которая не была специально модифицирована человеком в лаборатории, является природной.

Термин «нуклеиновая кислота», используемый в данной заявке, включает ДНК и РНК, такие как геномная ДНК, кДНК, мРНК, рекомбинантно полученные и химически синтезированные молекулы. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной. РНК включает транскрибируемую *in vitro* РНК (IVT РНК) или синтетическую РНК.

Нуклеиновые кислоты или наборы нуклеиновых кислот могут содержаться в векторе. Наборы нуклеиновых кислот также могут содержаться в наборах векторов, так что каждая нуклеиновая кислота из набора нуклеиновых кислот содержится в векторе. Термин «вектор», используемый в данной заявке, включает любые векторы, известные специалисту в данной области, включая плазмидные векторы, космидные векторы, фаговые векторы, такие как фаг лямбда, вирусные векторы, такие как аденовирусные или бакуловирусные векторы, или векторы-искусственные хромосомы, такие как

бактериальные искусственные хромосомы (BAC), дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) или искусственные хромосомы P1 (PAC). Указанные векторы включают экспрессирующие векторы, а также клонирующие векторы. Экспрессирующие векторы включают плазмиды, а также вирусные векторы и обычно содержат искомую кодирующую последовательность и соответствующие последовательности ДНК, необходимые для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине (например, бактериях, дрожжах, растении, насекомом или млекопитающем) или в системах экспрессии *in vitro*. Клонирование векторы обычно используются для конструирования и амплификации определенного желаемого фрагмента ДНК, и в них могут отсутствовать функциональные последовательности, необходимые для экспрессии желаемых фрагментов ДНК.

В контексте настоящего изобретения термин «РНК» относится к молекуле, которая содержит рибонуклеотидные остатки и предпочтительно полностью или по существу состоит из рибонуклеотидных остатков. «Рибонуклеотид» обозначает нуклеотид с гидроксильной группой в 2'-положении β -D-рибофуранозильной группы. Этот термин включает двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, выделенную РНК, такую как частично очищенная РНК, практически чистая РНК, синтетическая РНК, РНК, полученная рекомбинантным путем, а также модифицированная РНК, которая отличается от встречающейся в природе РНК вставкой, делецией, заменой и/или изменением одного или нескольких нуклеотидов. Такие изменения могут включать добавление ненуклеотидного материала, например, к концу(ам) РНК или внутри, например, к одному или нескольким нуклеотидам РНК. Нуклеотиды РНК-молекул также могут включать нестандартные нуклеотиды, такие как синтетические нуклеотиды или химически синтезированные нуклеотиды или дезоксинуклеотиды. Эти измененные РНК могут обозначаться как аналоги или аналоги природных РНК.

Согласно настоящему изобретению термин «РНК» включает и предпочтительно относится к «мРНК», что означает «информационная РНК», и относится к «транскрипту», который может быть получен с использованием ДНК в качестве матрицы и кодирует пептид или белок. мРНК обычно содержит 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), область, кодирующую белок или пептид, и 3'-нетранслируемую область (3'-UTR). мРНК имеет ограниченное время полураспада в клетках и *in vitro*. Предпочтительно мРНК получают путем транскрипции *in vitro* с использованием матрицы ДНК. В одном воплощении изобретения РНК получают путем транскрипции *in vitro* или химического синтеза. Специалистам известна методология транскрипции *in vitro*. Например, коммерчески доступны различные наборы для транскрипции *in vitro*.

В одном воплощении настоящего изобретения РНК представляет собой самореплицирующуюся РНК, такую как одноцепочечная самореплицирующаяся РНК. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК представляет собой одноцепочечную РНК с положительной полярностью. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК представляет собой вирусную РНК или РНК, полученную из вирусной РНК. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК представляет собой альфавирусную геномную РНК или получена из альфавирусной геномной РНК. Альфавирусная РНК может действовать как мРНК, как известно в данной области. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК представляет собой экспрессирующий вектор вирусного гена. В одном воплощении вирус представляет собой вирус леса Семлики. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК содержит один или несколько трансгенов, по меньшей мере, один из указанных трансгенов, кодирующий описанный в данной заявке связывающий агент. В одном воплощении, если РНК представляет собой вирусную РНК или получена из вирусной РНК, трансгены могут частично или полностью заменять вирусные последовательности, такие как вирусные последовательности, кодирующие структурные белки. В одном воплощении самореплицирующаяся РНК представляет собой РНК, транскрибируемую *in vitro*.

Чтобы повысить экспрессию и/или стабильность РНК, используемой согласно настоящему изобретению, ее можно модифицировать, предпочтительно без изменения последовательности экспрессируемого пептида или белка.

Термин «модификация» в контексте РНК, используемый согласно настоящему изобретению, включает любую модификацию РНК, которая в природе не присутствует в указанной РНК.

В одном воплощении изобретения РНК, используемая по изобретению, не содержит некэпированных 5'-трифосфатов. Удаление таких некэпированных 5'-трифосфатов может быть достигнуто путем обработки РНК с помощью фосфатазы.

РНК по изобретению может содержать модифицированные встречающиеся в природе или синтетические рибонуклеотиды с целью повышения ее стабильности и/или снижения цитотоксичности и/или иммуногенности. Например, в одном воплощении в РНК, использующейся по изобретению, 5-метилцитидин частично или полностью замещен, предпочтительно полностью, на цитидин. Альтернативно или дополнительно, в одном воплощении в РНК, использующейся по изобретению, псевдоуридин частично или полностью замещен, предпочтительно полностью, на уридин.

В одном воплощении термин «модификация» относится к предоставлению РНК с 5'-кэпом или аналогом 5'-кэпа. Термин «5'-кэп» относится к кэп-структуре, обнаруженной

на 5'-конце молекулы мРНК, и, как правило, состоящей из гуанозинового нуклеотида, связанного с мРНК посредством необычной 5'-5' трифосфатной связи. В одном воплощении этот гуанозин метилирован в 7-м положении. Термин «обычный 5'-кэп» относится к встречающемуся в природе 5'-кэпу РНК, предпочтительно к 7-метилгуанозинового кэпу (m7G). В контексте настоящего изобретения термин «5'-кэп» включает аналог 5'-кэпа, который напоминает структуру кэпа РНК и модифицирован, чтобы обладать способностью стабилизировать РНК при присоединении к ней, предпочтительно *in vivo* и/или в клетке.

Получение РНК с 5'-кэпом или аналогом 5'-кэпа может быть достигнуто путем транскрипции *in vitro* матрицы ДНК в присутствии указанного 5'-кэпа или аналога 5'-кэпа, где указанный 5'-кэп транскрипционно включают в генерируемую цепь РНК, или РНК может быть получена, например, путем транскрипции *in vitro*, а 5'-кэп может быть присоединен к РНК посттранскрипционно с использованием кэпирующих ферментов, например, кэпирующих ферментов вируса осповакцины.

РНК может включать дополнительные модификации. Например, дополнительная модификация РНК, используемой в настоящем изобретении, может представлять собой удлинение или укорочение встречающегося в природе хвоста поли(А) или изменение 5'-или 3'-нетранслируемых областей (UTR), например, введение UTR, которая не связана с кодирующей областью указанной РНК, например, вставка одной или нескольких, предпочтительно двух копий 3'-UTR, полученной из гена глобина, такого как альфа2-глобин, альфа1-глобин, бета-глобин, предпочтительно бета-глобин, более предпочтительно человеческий бета-глобин.

Таким образом, с целью повышения стабильности и/или экспрессии РНК, используемой по изобретению, она может быть модифицирована для представления в сочетании с поли-А-последовательностью, предпочтительно, имеющей длину 10-500 остатков аденозина, более предпочтительно, 30-300, еще более предпочтительно 65-200 и особенно 100-150 остатков аденозина. В особенно предпочтительном воплощении последовательность поли-А имеет длину приблизительно 120 остатков аденозина. Кроме того, включение двух или более 3'-нетранслируемых областей (UTR) в 3'-нетранслируемую область молекулы РНК может привести к повышению эффективности трансляции. В одном конкретном варианте 3'-UTR получен из гена β -глобина человека.

Предпочтительно, РНК, если доставлена в клетку, т.е. трансфицирована в нее, в частности, в клетку, присутствующую *in vivo*, экспрессирует белок, пептид или антиген, которые она кодирует.

Термин «трансфекция» относится к введению нуклеиновых кислот, в частности РНК, в клетку. Для целей настоящего изобретения термин «трансфекция» также включает введение нуклеиновой кислоты в клетку или поглощение нуклеиновой кислоты такой клеткой, при этом клетка может присутствовать у субъекта, например, пациента. Таким образом, согласно настоящему изобретению клетка для трансфекции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке, может присутствовать *in vitro* или *in vivo*, например, клетка может составлять часть органа, ткани и/или организма пациента. Согласно изобретению трансфекция может быть временной или стабильной. Для некоторых применений трансфекции достаточно, если трансфицированный генетический материал экспрессируется только временно. Поскольку нуклеиновая кислота, введенная в процессе трансфекции, обычно не интегрируется в ядерный геном, чужеродная нуклеиновая кислота будет разбавлена в результате митоза или разрушена. Клетки, допускающие эписомальную амплификацию нуклеиновых кислот, значительно снижают скорость разбавления. Если желательно, чтобы трансфицированная нуклеиновая кислота действительно оставалась в геноме клетки и ее дочерних клеток, то необходимо проводить стабильную трансфекцию. РНК может быть трансфицирована в клетки для временной экспрессии кодируемого ею белка.

Термин «стабильность» РНК относится к «периоду полувыведения» РНК. «Период полувыведения» относится к периоду времени, который необходим для потери половины активности, количества или числа молекул. В контексте настоящего изобретения, период полувыведения РНК является показателем стабильности указанной РНК. Период полувыведения РНК может влиять на «продолжительность экспрессии» РНК. Можно ожидать, что РНК, имеющая продолжительный период полувыведения, будет экспрессироваться в течение продолжительного периода времени.

В контексте настоящего изобретения термин «транскрипция» относится к процессу, где генетический код в ДНК-последовательности транскрибируется в РНК. Затем РНК может транслироваться в белок. В соответствии с настоящим изобретением термин «транскрипция» включает «транскрипцию *in vitro*», где термин «транскрипция *in vitro*» относится к процессу, при котором РНК, в частности мРНК, синтезируют *in vitro* в бесклеточной системе, предпочтительно с использованием соответствующих клеточных экстрактов. Предпочтительно, клонирующие векторы применяются для получения транскриптов. Эти клонирующие векторы, как правило, спроектированы как транскрипционные векторы и согласно изобретением охвачены термином «вектор».

Термин «трансляция» по изобретению относится к процессу в рибосомах клетки, посредством которого цепь информационной РНК направляет сборку последовательности аминокислот для образования пептида или белка.

Термин «экспрессия» используется по изобретению в его самом общем значении и включает продукцию РНК и/или пептидов или белков, например, путем транскрипции и/или перевода. Что касается РНК, термин «экспрессия» или «трансляция» относится, в частности, к продуцированию пептидов или белков. Также термин включает частичную экспрессию нуклеиновых кислот. Кроме того, экспрессия может быть временной или стабильной. Согласно изобретению термин экспрессия также включает «абберантную экспрессию» или «аномальную экспрессию».

«Абберантная экспрессия» или «аномальная экспрессия» означает по изобретению, что экспрессия изменяется, предпочтительно повышается по сравнению с референсным значением, например, с состоянием объекта, не имеющего заболевания, ассоциированного с абберантной или аномальной экспрессией определенного белка, например, опухолевого антигена. Повышение экспрессии относится к повышению, по меньшей мере, на 10%, в частности, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 50% или, по меньшей мере, на 100%, или более. В одном воплощении, экспрессия обнаружена только в больной ткани, в то время как экспрессия в здоровой ткани репрессирована.

Термин «специфично экспрессируется» означает, что белок экспрессируется по существу только в специфических ткани или в органе. Например, то, что опухолевый антиген специфично экспрессируется в слизистой желудка означает, что указанный белок главным образом экспрессируется в слизистой желудка и не экспрессируется в других тканях или не экспрессируется в значительной степени в других тканях или типах органов. Таким образом, белок, который экспрессируется исключительно в клетках слизистой желудка и в значительно меньшей степени в любой другой ткани, такой как яички, специфично экспрессируется в клетках слизистой желудка. В некоторых воплощениях, опухолевый антиген также может специфично экспрессироваться при нормальных условиях в более чем одном типе ткани, как например, в 2 или 3 типах тканей или органов, но предпочтительно, в не более чем 3 различных типах тканей или органов. В этом случае опухолевый антиген специфично экспрессируется в этих органах. Например, если опухолевый антиген экспрессируется при нормальных условиях предпочтительно в приблизительно равной степени в легком и в желудке, то указанный опухолевый антиген специфично экспрессируется в легком и в желудке.

Согласно изобретению термин «кодирование РНК» означает, что РНК, если она присутствует в подходящей среде, предпочтительно внутри клетки, может экспрессироваться с образованием белка или пептида, который она кодирует.

Некоторые аспекты изобретения основаны на адоптивном переносе клеток-хозяев, которые трансфицированы *in vitro* нуклеиновой кислотой, такой как РНК, кодирующей связывающий агент, описанный в настоящей заявке, и передаются реципиентам, таким как пациенты, предпочтительно после размножения *ex vivo* из низкого количества предшественников до клинически соответствующих количеств клеток. Клетки-хозяева, используемые для лечения по изобретению, могут быть аутологичными, аллогенными или сингенными для получающего лечение реципиента.

Термин «аутологичный» используется для описания того, что выделено из одного и того же объекта. Например, «аутологичный трансплантат» относится к трансплантату ткани или органов, полученному из одного и того же объекта. Такие процедуры являются предпочтительными, так как они преодолевают иммунологический барьер, который в ином случае приводит к отторжению.

Термин «аллогенный» используется для описания всего, что получено от разных особей одного и того же вида. Говорят, что два или более индивидуума аллогенны друг другу, когда гены в одном или нескольких локусах не идентичны.

Термин «сингенный» используется для описания всего, что получено от индивидуумов или тканей, имеющих идентичные генотипы, т.е. однояйцевых близнецов или животных одной и той же инбредной линии, или их тканей.

Термин «гетерологичный» используется для описания того, что состоит из множества различных элементов. Например, перенос костного мозга одного человека другому человеку представляет собой гетерологичный трансплантат. Гетерологичный ген представляет собой ген, выделенный из источника, отличного от субъекта.

Термин «пептид» по изобретению включает олиго- и полипептиды и относится к веществам, содержащим два или более, предпочтительно 3 или более, предпочтительно 4 или более, предпочтительно 6 или более, предпочтительно 8 или более, предпочтительно 9 или более, предпочтительно 10 или более, предпочтительно 13 или более, предпочтительно более 16, предпочтительно 21 или более и предпочтительно до 8, 10, 20, 30, 40 или 50, в частности 100 аминокислот, соединенных ковалентно пептидными связями. Термин «белок» относится к крупным пептидам, предпочтительно к пептидам с более чем 100 аминокислотными остатками, но в целом термины «пептиды» и «белки» являются синонимами и используются в данной заявке взаимозаменяемо.

Руководство, приведенное в настоящей заявке в связи с конкретными аминокислотными последовательностями, например, теми, которые показаны в списке последовательностей, должны быть истолкованы как относящиеся также к вариантам указанных конкретных последовательностей, в результате к последовательностям, которые функционально эквивалентны указанным конкретным последовательностям, например, аминокислотным последовательностям, обладающим свойствами, идентичными или сходными со свойствами конкретных аминокислотных последовательностей. Одним из важных свойств является сохранение связывания с мишенью или поддержание эффекторных функций. Предпочтительно последовательность, которая является вариантом по отношению к конкретной последовательности, когда она заменяет специфическую последовательность в антителе, сохраняет связывание указанного антитела с CLDN18.2 и/или CD3 и предпочтительно выполняет функции указанного антитела, как описано в настоящей заявке. Кроме того, предпочтительно, чтобы последовательность, которая является вариантом по отношению к конкретной последовательности, когда она заменяет специфическую последовательность в связывающем агенте, сохраняет связывание указанного связывающего агента с CLDN18.2 и/или CD3 и предпочтительно выполняет функции указанного связывающего агента, как описано в данной заявке, например, лизис цитотоксическими Т-клетками.

Например, последовательности, показанные в списке последовательностей, могут быть модифицированы таким образом, чтобы удалить один или несколько, предпочтительно все свободные остатки цистеина, в частности, путем замены остатков цистеина аминокислотами, отличными от цистеина, предпочтительно серином, аланином, треонином, глицином, тирозином, триптофаном, лейцином или метионином.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что, в частности, последовательности CDR, гипервариабельных и вариабельных областей могут быть модифицированы без потери способности связывать CLDN18.2 и/или CD3. Например, области CDR будут либо идентичны, либо в высокой степени гомологичны областям, указанным в настоящей заявке. Под «высоко гомологичным» подразумевается, что в CDR может быть сделано от 1 до 5, предпочтительно от 1 до 4, например, от 1 до 3, или 1, или 2 замены. Кроме того, гипервариабельные и вариабельные области могут быть модифицированы так, чтобы они демонстрировали существенную гомологию с областями, специально раскрытыми в настоящей заявке. В одном воплощении последовательности вариабельной области отличаются только по последовательностям

каркасной области от последовательностей вариабельной области, конкретно раскрытых в настоящей заявке.

Связывающие агенты по изобретению могут быть получены либо внутриклеточно (например, в цитозоле, в периплазме или в тельцах включения), а затем выделены из клеток-хозяев и необязательно дополнительно очищены; или они могут быть получены внеклеточно (например, в среде, в которой культивируются клетки-хозяева), а затем выделены из культуральной среды и необязательно дополнительно очищены. Способы и реагенты, используемые для рекомбинантной продукции полипептидов, такие как специфические подходящие экспрессирующие векторы, способы трансформации или трансфекции, маркеры селекции, способы индукции экспрессии белка, условия культивирования и т.п., известны в данной области техники. Аналогично, методы выделения и очистки белков хорошо известны специалисту.

Термин «клетка» или «клетка-хозяин» предпочтительно представляет собой интактную клетку, т.е. клетку с интактной мембраной, которая не высвобождала свои обычные внутриклеточные компоненты, такие как ферменты, органеллы или генетический материал. Интактная клетка предпочтительно представляет собой жизнеспособную клетку, т.е. живую клетку, способную осуществлять свои обычные метаболические функции. Предпочтительно указанный термин относится по изобретению к любой клетке, которая может быть трансфицирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Предпочтительно, чтобы клетка, трансфицированная экзогенной нуклеиновой кислотой и перенесенная реципиенту, могла экспрессировать нуклеиновую кислоту у реципиента. Термин «клетка» включает бактериальные клетки; другими полезными клетками являются дрожжевые клетки, грибковые клетки или клетки млекопитающих. Подходящие бактериальные клетки включают клетки грамотрицательных бактериальных штаммов, таких как штаммы *Escherichia coli*, *Proteus* и *Pseudomonas*, и грамположительных бактериальных штаммов, таких как штаммы *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* и *Lactococcus*. Подходящие грибные клетки включают клетки видов *Trichoderma*, *Neurospora* и *Aspergillus*. Подходящие дрожжевые клетки включают клетки видов *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (например, *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (например, *Pichia pastoris* и *Pichia methanolica*) и *Hansenula*. Подходящие клетки млекопитающих включают, например, клетки CHO, клетки ВНК, клетки HeLa, клетки COS, клетки 293 НЕК и т.п. Однако также можно использовать клетки амфибий, клетки насекомых, клетки растений и любые другие клетки, используемые в данной области техники для экспрессии гетерологичных белков. Для адоптивного переноса особенно предпочтительны клетки млекопитающих, такие как

клетки человека, мышей, хомяков, свиней, коз и приматов. Клетки могут происходить из большого числа типов тканей и включают первичные клетки и клеточные линии, такие как клетки иммунной системы, в частности антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки и Т-клетки, стволовые клетки, такие как гемопоэтические стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки и другие типы клеток. Антигенпрезентирующая клетка — это клетка, которая отображает антиген в контексте главного комплекса гистосовместимости на своей поверхности. Т-клетки могут распознавать этот комплекс с помощью своего Т-клеточного рецептора (TCR).

«Снижать», «уменьшать» или «ингибировать», при использовании в настоящей заявке, означает общее снижение или способность вызывать общее снижение, предпочтительно на 5% или более, 10% или более, 20% или более, более предпочтительно на 50% или более, более и наиболее предпочтительно 75% или более на уровне, например, по уровню экспрессии или по уровню пролиферации клеток.

Такие термины, как «увеличение» или «усиление», предпочтительно относятся к увеличению или усилению по меньшей мере на около 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 80% и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, 100%, по меньшей мере, 200%, по меньшей мере, 500%, по меньшей мере, 1000%, по меньшей мере, 10000% или даже больше.

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

АЗКЦ описывает способность эффекторных клеток убивать клетки, как описано в настоящей заявке, в частности лимфоцитов, что предпочтительно требует, чтобы клетка-мишень была помечена антителом.

АЗКЦ предпочтительно возникает, когда антитела связываются с антигенами на опухолевых клетках, а Fc-домены антител взаимодействуют с Fc-рецепторами (FcR) на поверхности иммунных эффекторных клеток. Было идентифицировано несколько семейств рецепторов Fc, и специфические клеточные популяции характерно экспрессируют определенные рецепторы Fc. АЗКЦ можно рассматривать как механизм прямой индукции немедленного разрушения опухоли различной степени, что приводит к презентации антигена и индукции Т-клеточных ответов, направленных на опухоль. Предпочтительно индукция АЗКЦ *in vivo* будет приводить к ответу Т-клеток, направленному против опухоли, и ответу антител хозяина.

Антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз

АЗКФ является одним из механизмов действия многих методов лечения антителами. Этот механизм определяется как строго регулируемый процесс, посредством которого антитела устраняют связанные мишени, соединяя свой Fc-домен со специфическими рецепторами на фагоцитирующих клетках и вызывая фагоцитоз. АЗКФ может опосредоваться моноцитами, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками через FcγRIIa, FcγRI и FcγRIIIa, из которых FcγRIIa (CD32a) на макрофагах представляет собой преобладающий путь.

АЗКФ предпочтительно возникает, когда неспецифические фагоцитарные клетки, которые экспрессируют FcγR, распознают антитело, которое связано с клетками-мишенями, такими как больные клетки, включая опухолевые клетки, и впоследствии вызывают фагоцитоз клеток-мишеней, таких как больные клетки, включая опухолевые клетки. АЗКФ также обеспечивает стимуляцию последующих адаптивных иммунных ответов путем облегчения презентации антигена или стимуляции секреции медиаторов воспаления. АЗКФ можно улучшить *in vivo* путем одновременного лечения иммуномодулирующими средствами. Fc-рецептор-зависимая функция АЗКФ обеспечивает механизмы удаления вируса и инфицированных вирусом клеток, а также стимуляцию последующих адаптивных иммунных ответов путем облегчения презентации антигена или стимуляции секреции медиаторов воспаления.

Комплемент-зависимая цитотоксичность

КЗЦ — еще один способ уничтожения клеток, которым могут управлять антитела. IgM является наиболее эффективным изотипом для активации комплемента. IgG1 и IgG3 также очень эффективны в управлении КЗЦ посредством классического пути активации комплемента. Предпочтительно в этом каскаде образование комплексов антиген-антитело приводит к раскрытию множества сайтов связывания C1q в непосредственной близости от доменов CH2 участвующих молекул антител, таких как молекулы IgG (C1q является одним из трех субкомпонентов комплемента C1). Предпочтительно эти незамаскированные сайты связывания C1q преобразуют ранее низкоаффинное взаимодействие C1q-IgG во взаимодействие с высокой авидностью, что запускает каскад событий с участием ряда других белков комплемента и приводит к протеолитическому высвобождению хемотаксических/активирующих агентов для эффекторной клетки C3a и C5a. Каскад комплемента предпочтительно заканчивается образованием мембраноатакующего комплекса, который создает поры в клеточной мембране, облегчающие свободный проход воды и растворенных веществ в клетку и из нее.

Связывающие агенты и антитела, описанные в данной заявке, могут быть получены различными методами, включая общепринятую методику моноклональных антител,

например, стандартную методику гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе могут быть использованы другие методы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом, секретирующих моноклональные связывающие агенты, такие как моноклональные антитела, является мышьяная система. Получение гибридом у мышей является очень хорошо отработанной процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры слияния (например, мышьяные миеломные клетки) и процедуры слияния также известны. Другими предпочтительными животными системами для получения гибридом, которые секретируют моноклональные связывающие агенты, такие как моноклональные антитела, являются крысиная и кроличья системы (например, описанные в Spieker-Polet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9348 (1995), см. также Rossi et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 124: 295 (2005)).

В еще одном предпочтительном воплощении человеческие связывающие агенты, такие как человеческие антитела, можно получить с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не мышьяной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, известных как мыши HuMAb и мыши КМ, соответственно, и все вместе именуются в данной заявке «трансгенными мышами». Получение человеческих связывающих агентов, таких как человеческие антитела, в таких трансгенных мышей можно осуществлять, как подробно описано применительно к CD20 в WO2004 035607.

Еще одна стратегия создания моноклональных связывающих агентов, таких как моноклональные антитела, заключается в прямом выделении генов, кодирующих антитела, из лимфоцитов, продуцирующих связывающие агенты определенной специфичности, например, см. Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal binding agents such as monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing binding agents of defined specificities. Подробную информацию о разработке рекомбинантных связывающих агентов см. также в Welschof and Kraus, *Recombinant Antitoxin for Cancer Therapy* ISBN-0-89603-918-8 и Benny K.C. Lo *Antibody Engineering* ISBN 1-58829-092-1.

Для получения антител мышей можно иммунизировать пептидами, конъюгированными с носителем, полученными из последовательности антигена, т.е.

последовательности, против которой должны быть направлены антитела, обогащенного препарата рекомбинантно экспрессируемого антигена или его фрагментов и/или клеток, экспрессирующих антиген, как описано. Альтернативно мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей антиген или ее фрагменты. В случае, если иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена не приводит к образованию антител, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими антиген, например, клеточной линией, для стимулирования иммунных ответов. Иммунный ответ можно контролировать в ходе протокола иммунизации с образцами плазмы и сыворотки, полученными из хвостовой вены или ретроорбитального кровотечения. Мышей с достаточными титрами иммуноглобулина можно использовать для слияний. Мышей можно ревакцинировать внутрибрюшинно или внутривенно клетками, экспрессирующими антиген, за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки, чтобы увеличить количество гибридом, секретирующих специфические антитела.

Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, спленоциты и клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей можно выделить и объединить с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия мышинной миеломы. Затем полученные гибридомы могут быть подвергнуты скринингу на продуцирование антиген-специфических антител. Отдельные лунки затем можно подвергнуть скринингу с помощью ELISA на наличие гибридом, секретирующих антитела. С помощью иммунофлуоресцентного и FACS-анализа с использованием клеток, экспрессирующих антиген, можно идентифицировать антитела, специфичные к антигену. Гибридомы, секретирующие антитела, могут быть пересеяны, снова подвергнуты скринингу и, если они по-прежнему положительны в отношении моноклональных антител, могут быть субклонированы путем предельного разведения. Затем стабильные субклоны можно культивировать *in vitro* для получения антител в культуральной среде ткани для характеристики.

Связывающие агенты, такие как антитела, также могут быть получены в трансфекторе клетки-хозяина, используя, например, комбинацию методов рекомбинантной ДНК и методов генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области техники (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Например, в одном воплощении представляющий(ие) интерес ген(ы), например, гены антител, можно лигировать в экспрессирующий вектор, такой как эукариотическая экспрессионная плаزمид, такая как используемая системой экспрессии генов GS, описанной в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338 841 или другие экспрессирующие

системы, хорошо известные в данной области. Очищенная плазмида с клонированными генами антитела может быть введена в эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки СНО, клетки NS/0, клетки НЕК293Т или клетки НЕК293, или альтернативно другие эукариотические клетки, такие как клетки растительного происхождения, грибные или дрожжевые клетки. Способ, используемый для введения этих генов, может представлять собой способы, описанные в данной области техники, такие как электропорация, липофектин, липофектамин или другие. После введения этих генов антител в клетки-хозяева можно идентифицировать и отобрать клетки, экспрессирующие антитела. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые затем могут быть амплифицированы для достижения уровня их экспрессии и увеличены для получения антител. Рекомбинантные антитела могут быть выделены и очищены из этих культуральных надосадочных жидкостей и/или клеток.

Альтернативно, гены клонированного связывающего агента, например, антитела, могут быть экспрессированы в других системах экспрессии, включая прокариотические клетки, такие как микроорганизмы, например, кишечная палочка. Кроме того, связывающие агенты, например, антитела, могут быть продуцированы в трансгенных животных, отличных от человека, например, в молоке овец и кроликов или в яйцах кур, или в трансгенных растениях (см., например, Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; и Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839).

Химеризация

Немеченые мышинные антитела обладают высокой иммуногенностью у человека при многократном применении, что приводит к снижению терапевтического эффекта. Основная иммуногенность опосредована константными областями тяжелой цепи. Иммуногенность связывающих агентов, полученных из мышинных антител у человека, можно снизить или полностью избежать, если соответствующие связывающие агенты химеризировать или гуманизировать. Химерные связывающие агенты представляют собой связывающие агенты, различные части которых получены от разных видов животных, например, имеющие переменную область, полученную из мышинного антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина. Химеризация связывающих агентов достигается путем соединения переменных областей тяжелой и легкой цепи мышинного антитела с константной областью тяжелой и легкой цепи человека (например, как описано Kraus et al., в *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). В предпочтительном воплощении химерные связывающие агенты получают путем присоединения константной области легкой цепи

каппа человека к вариабельной области легкой цепи мыши. В еще одном предпочтительном воплощении химерные связывающие агенты могут быть получены путем присоединения константной области лямбда-легкой цепи человека к вариабельной области легкой цепи мыши. Предпочтительными константными областями тяжелой цепи для создания химерных связывающих агентов являются IgG1, IgG3 и IgG4. Другими предпочтительными константными областями тяжелой цепи для создания химерных связывающих агентов являются IgG2, IgA, IgD и IgM.

Гуманизация

Связывающие агенты, такие как антитела, взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести областях, определяющих комплементарность тяжелой и легкой цепей (CDR). По этой причине аминокислотные последовательности внутри CDR более разнообразны между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные связывающие агенты, например, антитела, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, путем конструирования экспрессирующих векторов, которые включают последовательности CDR из специфического встречающегося в природе антитела, привитого в каркасные последовательности из другого антитела с разными свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; и Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Эти последовательности зародышевой линии будут отличаться от последовательностей генов зрелых антител, поскольку они не будут включать полностью собранные вариабельные гены, которые образуются путем соединения V(D)J во время созревания В-клеток. Последовательности генов зародышевой линии также будут отличаться от последовательностей высокоаффинного вторичного репертуара антител у индивидуума равномерно по всей вариабельной области.

Способность антител и других связывающих агентов связывать антиген можно определить с помощью стандартных анализов связывания (например, ELISA, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция и анализ проточной цитометрией).

Для очистки связывающих агентов, таких как антитела, выбранные клеточные линии-продуценты можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки рекомбинантных антител. Альтернативно, связывающие агенты, такие как антитела,

можно производить в биореакторах на основе диализа. Надосадочные жидкости можно фильтровать и, при необходимости, концентрировать перед аффинной хроматографией с протеин L-сефарозой. Элюированные связывающие агенты можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на ФСБ, а концентрацию можно определить по OD280 с использованием соответствующего коэффициента экстинкции. Рекомбинантные связывающие агенты можно разделить на аликвоты и хранить при температуре от -65 до -85°C.

Чтобы продемонстрировать связывание моноклональных связывающих агентов, таких как моноклональные антитела, с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать проточную цитометрию. Клеточные линии, экспрессирующие антиген естественным путем или после трансфекции, и отрицательные контроли, не экспрессирующие антиген (выращенные в стандартных условиях выращивания), можно смешивать с различными концентрациями моноклональных антител в супернатантах гибридом или в ФСБ, содержащем 1% ФБС, и инкубировать при 4°C для 30 минут. После промывания флуоресцентно-меченный реагент для обнаружения (такой как флуоресцентно-конъюгированное антитело против IgG, антитело против Fab или протеин-L) может связываться с антигенсвязанным моноклональным связывающим агентом в тех же условиях, что и при окрашивании первичного связывающего агента. Образцы можно анализировать с помощью проточной цитометрии с помощью прибора FACS, используя свойства света и бокового рассеяния для выделения отдельных живых клеток. Чтобы отличить антигенспецифические моноклональные связывающие агенты от неспецифических связывающих агентов в одном измерении, можно использовать метод котрансфекции. Клетки, временно трансфицированные плазмидами, кодирующими антиген и флуоресцентный маркер, можно окрашивать, как описано выше. Трансфицированные клетки можно обнаружить по другому каналу флуоресценции, чем клетки, окрашенные связывающим агентом. Поскольку большинство трансфицированных клеток экспрессируют оба трансгена, антигенспецифические моноклональные связывающие агенты предпочтительно связываются с клетками, экспрессирующими флуоресцентный маркер, тогда как неспецифические связывающие агенты связываются в сопоставимом соотношении с нетрансфицированными клетками. Альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии может быть использован (в дополнение или вместо) анализа проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии.

Чтобы продемонстрировать связывание моноклональных связывающих агентов, таких как моноклональные антитела, с живыми клетками, экспрессирующими антиген, можно использовать анализ на основе иммунофлуоресцентной микроскопии. Например, клеточные линии, экспрессирующие антиген спонтанно или после трансфекции, и отрицательные контроли, не экспрессирующие антиген, выращивают на предметных стеклах камеры в стандартных условиях роста в среде DMEM/F12, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS), 2 mM L-глутамина, 100 ME/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки можно зафиксировать метанолом или параформальдегидом или оставить без обработки. Затем клетки можно подвергнуть реакции с моноклональными связывающими агентами против антигена в течение 30 минут при 25°C. После промывания клетки можно подвергнуть реакции с меченым Alexa555 вторичным антителом против мышинового IgG (Molecular Probes) в тех же условиях. Затем клетки можно исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии.

Клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих антиген, и соответствующие отрицательные контроли могут быть приготовлены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН). После электрофореза отделенные антигены переносят на нитроцеллюлозные мембраны, блокируют и исследуют с помощью тестируемых моноклональных связывающих агентов. Связывание IgG можно обнаружить с помощью антитела против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой и проявить с помощью субстрата ECL.

Связывающие агенты, такие как антитела, могут быть дополнительно протестированы на реактивность с антигеном с помощью иммуногистохимии способом, хорошо известным специалисту в данной области техники, например, использование криосрезов, фиксированных параформальдегидом или ацетоном, или залитых в парафин срезом тканей, фиксированных параформальдегидом, из образцов незлокачественной ткани или ткани рака, полученных от пациентов во время рутинных хирургических процедур или от мышей, несущих ксенотрансплантированные опухоли, инокулированных клеточными линиями, экспрессирующими антиген спонтанно или после трансфекции. Для иммуноокрашивания можно инкубировать связывающие агенты, реагирующие на антиген, с последующим введением козьих антимышиных или козьих антикроличьих антител (DAKO), конъюгированных с пероксидазой хрена, в соответствии с инструкциями поставщиков.

Доклинические исследования

Связывающие агенты, описанные в настоящей заявке, также могут быть протестированы на модели *in vivo* (например, на мышах с иммунодефицитом, несущих

ксенотрансплантированные опухоли, инокулированные клеточными линиями, экспрессирующими CLDN18.2), для определения их эффективности в контроле роста опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Исследования *in vivo* после ксенотрансплантации опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN18.2, мышам с ослабленным иммунитетом или другим животным можно проводить с использованием связывающих агентов, описанных в настоящей заявке. Связывающие агенты и, необязательно, эффекторные клетки, такие как МКПК, можно вводить мышам без опухолей с последующей инъекцией опухолевых клеток для измерения эффектов связывающих агентов для предотвращения образования опухолей или связанных с опухолями симптомов. Связывающие агенты и, необязательно, эффекторные клетки, такие как МКПК, можно вводить мышам с опухолями для определения терапевтической эффективности соответствующих связывающих агентов для уменьшения роста опухоли, метастазирования или симптомов, связанных с опухолью. Применение связывающих агентов и, необязательно, эффекторных клеток можно комбинировать с применением других веществ, таких как цистостатические лекарственные средства, ингибиторы факторов роста, блокаторы клеточного цикла, ингибиторы ангиогенеза или антитела, для определения повышенной эффективности и потенциальной токсичности комбинаций. Для анализа токсических побочных эффектов, опосредованных связывающими агентами, животным можно инокулировать связывающие агенты, как описано в настоящей заявке, или контрольные реагенты и тщательно исследовать симптомы, возможно, связанные с терапией агентом, связывающим CLDN18.2.

Картирование эпитопов, распознаваемых связывающими агентами, можно выполнить, как подробно описано в «Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 и в «Epitope Mapping: A Practical Approach» Practical Approach Series, 248 by ISBN-089603-375-9 и в «Epitope Mapping: A Practical Approach» Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

Соединения и агенты, описанные в данной заявке, можно вводить в форме любой подходящей фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции по изобретению предпочтительно являются стерильными и содержат эффективное количество описанных в данной заявке связывающих агентов и, необязательно, дополнительных агентов, обсуждаемых в данной заявке, для создания желаемой реакции или желаемого эффекта.

Фармацевтические композиции обычно представлены в виде однородной лекарственной формы и могут быть приготовлены способами, известными *per se*. Фармацевтическая композиция может, например, быть в форме раствора или суспензии.

Фармацевтическая композиция может содержать соли, буферные вещества, консерванты, носители, разбавители и/или наполнители, все из которых предпочтительно являются фармацевтически приемлемыми. Термин «фармацевтически приемлемый» относится к нетоксичности материала, который не взаимодействует с действием активного компонента фармацевтической композиции.

Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть использованы для получения фармацевтически приемлемых солей и включены в изобретение. Фармацевтически приемлемые соли такого типа включают, неограничивающим образом, соли, полученные из следующих кислот: соляной, бромистоводородной, серной, азотной, фосфорной, малеиновой, уксусной, салициловой, лимонной, муравьиной, малоновой, янтарной кислот и т.п. Фармацевтически приемлемые соли также могут быть получены в виде солей щелочных металлов или солей щелочноземельных металлов, таких как соли натрия, соли калия или соли кальция.

Подходящие буферные вещества для применения в фармацевтической композиции включают уксусную кислоту в соли, лимонную кислоту в соли, борную кислоту в соли и фосфорную кислоту в соли.

Подходящие консерванты для применения в фармацевтической композиции включают хлорид бензалкония, хлорбутанол, парабен и тимеросал.

Препарат для инъекций может содержать фармацевтически приемлемый наполнитель, такой как лактат Рингера.

Термин «носитель» относится к органическому или неорганическому компоненту естественной или синтетической природы, в который объединен активный компонент для облегчения, улучшения или обеспечения возможности применения. Согласно изобретению термин «носитель» также включает один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей или инкапсулирующих веществ, которые подходят для введения пациенту.

Возможными веществами-носителями для парентерального введения являются, например, стерильная вода, Рингер, лактат Рингера, стерильный раствор хлорида натрия, полиалкиленгликоли, гидрированные нафталины и, в частности, биосовместимые полимеры лактида, сополимеры лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена/полиоксипропилена.

Термин «наполнитель», используемый в данной заявке, предназначен для обозначения всех веществ, которые могут присутствовать в фармацевтической композиции и которые не являются активными ингредиентами, таких как, например, носители, связующие вещества, смазывающие вещества, загустители, поверхностно-активные вещества, консерванты, эмульгаторы, буферы, ароматизаторы или красители.

Описанные в данной заявке агенты и композиции можно вводить любым общепринятым путем, например, парентеральным введением, включая инъекцию или инфузию. Введение предпочтительно осуществляется парентерально, например, внутривенно, внутриаартериально, подкожно, внутрикочно или внутримышечно.

Композиции, подходящие для парентерального введения, обычно содержат стерильный водный или неводный препарат активного соединения, который предпочтительно является изотоническим по отношению к крови реципиента. Примеры совместимых носителей и растворителей это раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно используются стерильные фиксированные масла в качестве раствора или суспензионной среды.

Описанные в данной заявке агенты и композиции вводят в эффективных количествах. «Эффективное количество» относится к количеству, которое достигает целевой реакции или целевого эффекта индивидуально или совместно с другими дозами. В случае лечения конкретного заболевания или конкретного состояния, целевая реакция предпочтительно относится к ингибированию течения заболевания. Это включает замедление прогресса заболевания и, в частности, прекращение или реверсию прогресса заболевания. Целевой реакцией в лечении заболевания или состояния также может быть задержка проявления или предотвращение приступа указанного заболевания или указанного состояния.

Эффективное количество агента, описанного в данной заявке, будет зависеть от состояния, подвергаемого лечению, от тяжести заболевания, индивидуальных параметров пациента, включающих возраст, физиологическое состояние, размер и массу, продолжительность лечения, тип сопровождающейся терапии (если имеется), специфический путь введения и подобные факторы. Соответственно, вводимые дозы агентов, описанных в данной заявке, могут зависеть от множества таких параметров. В случае, когда реакция пациента недостаточна при начальной дозе, могут использоваться более высокие дозы (или эффективно более высокие дозы, достигнутые с помощью другого более точно локализованного пути введения).

Агенты и композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить пациентам, например, *in vivo*, для лечения или предотвращения различных нарушений, таких как

описанные в настоящей заявке. Предпочтительные пациенты включают пациентов-людей, страдающих расстройствами, которые можно скорректировать или улучшить путем введения агентов и композиций, описанных в настоящей заявке. Сюда входят заболевания, затрагивающие клетки, характеризующиеся измененным характером экспрессии CLDN18.2.

Например, в одном воплощении агенты, описанные в настоящей заявке, можно использовать для лечения пациента с онкологическим заболеванием, например, онкологическим заболеванием, таким как описанное в настоящей заявке, характеризующимся наличием раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

Фармацевтические композиции и способы лечения, описанные в соответствии с изобретением, также могут быть использованы для иммунизации или вакцинации для предотвращения описанного в данной заявке заболевания.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить вместе с дополнительными веществами, усиливающими иммунитет, такими как один или несколько адъювантов, и она может содержать одно или несколько веществ, повышающих иммунитет, для дальнейшего повышения ее эффективности, предпочтительно для достижения аддитивного эффекта иммуностимуляции. Термин «адъювант» относится к соединениям, которые продлевают, усиливают или ускоряют иммунный ответ. В этом отношении возможны различные механизмы в зависимости от различных типов адъювантов. Например, соединения, которые способствуют созреванию DC, например, липополисахариды или лиганд CD40 образуют первый класс подходящих адъювантов. Как правило, в качестве адъюванта, позволяющего усилить иммунный ответ и/или оказывает на него контролируемое воздействие, можно использовать любой агент, влияющий на иммунную систему типа «сигнала опасности» (LPS, GP96, dsRNA и т.д.) или цитокины, например, GM-CSF. В этом контексте также можно необязательно использовать CpG-олигонуклеотиды, хотя следует учитывать их побочные эффекты, которые возникают при определенных обстоятельствах, как объяснено выше. Особенно предпочтительными адъювантами являются цитокины, такие как монокины, лимфокины, интерлейкины или хемокины, например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF α , INF- γ , GM-CSF, LT- α , или факторы роста, например, hGH. Другими известными адъювантами являются гидроксид алюминия, адъювант Фрейнда или масло, такое как Montanide®, наиболее предпочтительно Montanide® ISA51. Липопептиды, такие как Pam3Cys, также подходят для использования в качестве адъювантов в фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Агенты и композиции, представленные в данной заявке, могут использоваться индивидуально или в комбинации со стандартными терапевтическими схемами, такими как хирургическая операция, облучение, химиотерапия и/или трансплантация костного мозга (аутологичная, синергическая, аллогенная или чужеродная).

Лечение рака представляет собой область, где комбинированные стратегии особенно желательны, поскольку часто комбинированное действие двух, трех, четырех или даже более противоопухолевых лекарственных средств/терапий приводит к синергетическому эффекту, который значительно сильнее, чем воздействие монотерапевтического подхода. Таким образом, в другом воплощении настоящего изобретения лечение рака, в котором используются механизмы, основанные на иммунитете или вакцинации, такие как способы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению, может эффективно сочетаться с различными другими лекарственными средствами и/или способами, нацеленными на подобные или другие конкретные механизмы. Среди них, например, комбинации с традиционными методами лечения опухолей, мультиэпитопными стратегиями, дополнительной иммунотерапией и подходами к лечению, направленными на ангиогенез или апоптоз (обзор см., например, Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 57(11): 1735-1743). Последовательное введение различных агентов может ингибировать рост раковых клеток в разных контрольных точках, в то время как другие агенты могут, например, ингибировать неоангиогенез, выживание злокачественных клеток или метастазов, потенциально превращая рак в хроническое заболевание. В следующем перечне представлены некоторые неограничивающие примеры противоопухолевых лекарственных средств и методов лечения, которые можно использовать в сочетании с настоящим изобретением:

1. Химиотерапия

Химиотерапия является стандартом лечения многих типов рака. Наиболее распространенные химиотерапевтические агенты действуют, убивая клетки, которые быстро делятся, что является одним из основных свойств раковых клеток. Таким образом, комбинация с обычными химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как, например, алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые агенты, которые влияют либо на деление клеток, либо на синтез ДНК, могут значительно улучшить терапевтические эффекты настоящего изобретения путем очистки клеток-супрессоров, перезагрузки иммунной системы, путем приведения опухолевых клеток в более восприимчивое к иммуноопосредованному уничтожению состояние или дополнительной

активации клеток иммунной системы. Аддитивное противоопухолевое действие химиотерапевтических и иммунотерапевтических препаратов на основе вакцинации было продемонстрировано в многочисленных исследованиях (см., например, Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* 12(12): 1125-33.; см. также Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 6920979; см. также Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38(3): e69-74). Существуют сотни химиотерапевтических лекарственных средств, которые в основном подходят для комбинированной терапии. Некоторыми (неограничивающими) примерами химиотерапевтических лекарственных средств, которые можно комбинировать с настоящим изобретением, являются карбоплатин (Paraplatin), цисплатин (Platinol, Platinol-AQ), циклофосфамид (Cytosan, Neosar), доцетаксел (Taxotere), доксорубицин (Adriamycin), эрлотиниб (Tarceva), этопозид (VePesid), гемцитабин (Gemzar), мезилат иматиниба (Gleevec), иринотекан (Camptosar), метотрексат (Folex, Mexate, Amethopterin), паклитаксел (Taxol, Abraxane), сорафиниб (Nexavar), сунитиниб (Sutent), топотекан (Hycamtin), винкристин (Oncovin, Vincasar PFS) и винбластин (Velban).

2. Оперативное вмешательство

Онкологическая хирургия – операция по удалению опухоли – остается основой лечения рака. Оперативное вмешательство можно комбинировать с другими методами лечения рака, чтобы удалить оставшиеся опухолевые клетки. Сочетание хирургических методов с последующим иммунотерапевтическим лечением является многообещающим подходом, который был продемонстрирован бесчисленное количество раз.

3. Ионизирующее излучение

Лучевая терапия остается важным компонентом лечения рака: приблизительно 50% всех онкологических больных получают лучевую терапию во время болезни. Основная цель лучевой терапии – лишить раковые клетки их потенциала размножения (клеточного деления). Типы излучения, используемые для лечения рака, — это фотонное излучение (рентгеновские и гамма-лучи) и излучение частиц (электронные, протонные и нейтронные пучки). Существует два способа доставки излучения к месту расположения рака. Внешнее направленное излучение осуществляется снаружи тела путем направления лучей высокой энергии (фотонов, протонов или частиц) на место опухоли. Внутреннее облучение или брахитерапия осуществляется изнутри организма с помощью радиоактивных источников, запечатанных в катетеры или имплантируемые источники излучения непосредственно в

участок опухоли. Методами лучевой терапии, которые применимы в сочетании с настоящим изобретением, являются, например, фракционирование (лучевая терапия, проводимая во фракционированном режиме, например, ежедневные фракции от 1,5 до 3 Гр, вводимые в течение нескольких недель), 3D-конформная лучевая терапия (3DCRT; доставка излучения на общий объем опухоли), лучевая терапия с модулированной интенсивностью (IMRT; модуляция нескольких лучей излучения с контролируемой компьютером интенсивностью), лучевая терапия под визуальным контролем (IGRT; метод, включающий визуализацию перед лучевой терапией, которая позволяет проводить коррекцию) и стереотаксическая лучевая терапия тела (SRBT, обеспечивает очень высокие индивидуальные дозы радиации всего за несколько фракций лечения). Обзор лучевой терапии см. Baskar et al. 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J Med Sci.* 9(3): 193–199.

4. Антитела

Антитела (предпочтительно моноклональные антитела) достигают своего терапевтического эффекта против раковых клеток посредством различных механизмов. Они могут иметь прямое воздействие на апоптоз или запрограммированную гибель клеток. Они могут блокировать компоненты путей передачи сигнала, такие как, например, рецепторы факторов роста, эффективно останавливающие пролиферацию опухолевых клеток. В клетках, экспрессирующих моноклональные антитела, они могут вызывать образование антиидиотипических антител. Косвенные эффекты включают рекрутирование клеток, обладающих цитотоксичностью, таких как моноциты и макрофаги. Этот тип уничтожения клеток, опосредованного антителами, называется антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (АЗКЦ). Антитела также связывают комплемент, что приводит к прямой клеточной токсичности, известной как комплементзависимая цитотоксичность (КЗЦ). Более того, антитела, связанные с клеткой-мишенью, могут распознаваться неспецифическими фагоцитирующими клетками, вызывающими фагоцитоз клетки-мишени, известный как антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ). Сочетание хирургических методов с иммунотерапевтическими препаратами или способами является успешным подходом, например, продемонстрированным Gadri et al. 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. *J Immunother.* 32(4): 333-40. В следующем перечне представлены некоторые неограничивающие примеры противоопухолевых антител и потенциальных мишеней антител (в скобках), которые можно использовать в сочетании с настоящим изобретением: абаговомаб (CA-125), абциксимаб (CD41), адекватумаб (EPCAM), афутузумаб (CD20),

алацизумаб пегол (VEGFR2), пентетат алтумомаба (CEA), аматуксимаб (MORAb-009), анатумомаб мафенатокс (TAG-72), аполизумаб (HLA-DR), арцитумомаб (CEA), бавитуксимаб (фосфатидилсерин), бектумомаб (CD22), белимумаб (BAFF), бевацизумаб (VEGF-A), биватузумаб мертанзин (CD44 v6), блинатумомаб (CD19), брентуксимаб ведотин (CD30 TNFRSF8), кантузумаб мертанзин (муцин CanAg), кантузумаб равтанзин (MUC1), капромаб пендетид (клетки карциномы предстательной железы), карлумаб (CNTO888), катумаксамаб (EpcAM, CD3), цетуксимаб (EGFR), цитатузумаб богатокс (EpcAM), циксутумумаб (рецептор IGF-1), кливатузумаб тетраксетан (MUC1), конатумумаб (TRAIL-R2), дацетузумаб (CD40), далотузумаб (рецептор инсулиноподобного фактора роста I), деносумаб (RANKL), детумомаб (клетка В-лимфомы), дрозитумаб (DR5), экромексимаб (ганглиозид GD3), эдрекколомаб (EpcAM), элотузумаб (SLAMF7), энаватузумаб (PDL192), энситуксимаб (NPC-1C), эпратузумаб (CD22), эртумаксамаб (HER2/neu, CD3), этарасизумаб (интегрин $\alpha\beta 3$), фарлетузумаб (фолатный рецептор 1), FBTa05 (CD20), фиклатузумаб (SCH 900105), фигитумумаб (рецептор IGF-1), фланвотумаб (гликопротеин 75), фрезолимумаб (TGF- β), галиксимаб (CD80), ганитумаб (IGF-I), гемтузумаб озогамидин (CD33), гевокизумаб (IL-1 β), гирентуксимаб (карбоангидраза 9 (CA-IX)), глембатумумаб ведотин (GPNMB), ибритумомаб тиуксетан (CD20), икрукумаб (VEGFR-1), игова (CA-125), индатуксимаб равтанзин (SDC1), интетумумаб (CD51), инотузумаб озогамидин (CD22), иратумумаб (CD30), лабетузумаб (CEA), лексатумумаб (TRAIL-R2), либивирумаб (поверхностный антиген вируса гепатита В), линтузумаб (CD33), лорвотузумаб мертанзин (CD56), лукатумумаб (CD40), люмиликсимаб (CD23), мапатумумаб (TRAIL-R1), матузумаб (EGFR), меполизумаб (IL-5), милатузумаб (CD74), митумомаб (ганглиозид GD3), могамулизумаб (CCR4), моксетумомаб пасудотокс (CD22), наколомаб тафенатокс (антиген C242), наптумомаб эстафенатокс (5T4), нарнатумаб (RON), нецитумумаб (EGFR), нимотузумаб (EGFR), офатумумаб (CD20), оларатумаб (PDGF-R α), онартузумаб (киназа рецептора фактора рассеяния человека), опортузумаб монатокс (EpcAM), ореговомаб (CA-125), окселумаб (OX-40), панитумумаб (EGFR), патритумаб (HER3), пемтумома (MUC1), пертузумаб (HER2/neu), пинтумомаб (антиген аденокарциномы), притумумаб (виментин), ракотумомаб (N-гликолилнейраминовая кислота), радретумаб (дополнительный домен-В фибронектина), рафивирумаб (гликопротеин вируса бешенства), рамуцирумаб (VEGFR2), рилотумумаб (HGF), ритуксимаб (CD20), робатумумаб (рецептор IGF-1), самализумаб (CD200), сибротузумаб (FAP), силтуксимаб (IL-6), табалумаб (BAFF), такатузумаб тетраксетан (альфа-фетопроtein), таплитумомаб паптокс (CD19), тенатумомаб (тенасцин C), тепротумумаб (CD221), тигатузумаб (TRAIL-

R2), TNX-650 (IL-13), тозитумаб (CD20), трастузумаб (HER2/neu), TRBS07 (GD2), тукотузумаб целмолейкин (EpcAM), ублитуксимаб (MS4A1), урелумаб (4-1BB), волоциксимаб (интегрин $\alpha 5\beta 1$), вотумумаб (опухолевый антиген CTAА16.88), залутумумаб (EGFR), занолимуаb (CD4).

5. Цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы, гибридные белки

Комбинированное применение фармацевтических композиций по настоящему изобретению с цитокинами, хемокинами, костимулирующими молекулами и/или их гибридными белками для того, чтобы вызвать полезную иммуномодуляцию или эффекты ингибирования опухоли, является другим воплощением настоящего изобретения. Для увеличения инфильтрации иммунных клеток в опухоль и облегчения перемещения антигенпредставляющих клеток к дренирующим опухоль лимфатическим узлам можно использовать различные хемокины со структурами C, CC, CXC и CX3C. Некоторыми из наиболее многообещающих хемокинов являются, например, CCR7 и его лиганды CCL19 и CCL21, а также CCL2, CCL3, CCL5 и CCL16. Другими примерами являются CXCR4, CXCR7 и CXCL12. Кроме того, костимулирующие или регуляторные молекулы, такие как, например, лиганды B7 (B7.1 и B7.2) полезны. Также полезны другие цитокины, такие как, например, особенно интерлейкины (например, от IL-1 до IL17), интерфероны (например, от IFN-альфа1 до IFN-альфа8, IFN-альфа10, IFN-альфа13, IFN-альфа14, IFN-альфа16, IFN-альфа17, IFN-альфа21, IFNbeta1, IFNW, IFNE1 и IFNK), кроветворные факторы, TGF (например, TGF- α , TGF- β и другие представители семейства TGF), наконец, представители семейства рецепторов фактора некроза опухоли и их лиганды, а также другие стимулирующие молекулы, включая, без ограничения указанным, 4-1BB, 4-1BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFRII, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT и CD95 (Fas/APO-1), глюкокортикоид-индуцированный белок, родственник рецептору TNF белок, опосредующий апоптоз (TRAMP) и рецептор смерти-6 (DR6). В частности, CD40/CD40L и OX40/OX40L являются важными мишенями для комбинированной иммунотерапии из-за их прямого влияния на выживаемость и пролиферацию Т-клеток. Обзор см. в Lechner et al. 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340.

6. Бактериальные обработки

Исследователи использовали анаэробные бактерии, такие как *Clostridium novyi*, для уничтожения внутренней части опухолей с низким содержанием кислорода. Затем они должны погибнуть при контакте с насыщенными кислородом сторонами опухоли, а это

означает, что они будут безвредны для остальной части тела. Другая стратегия заключается в применении анаэробных бактерий, трансформированных ферментом, способным превращать нетоксичное пролекарство в токсичное лекарственное средство. При пролиферации бактерий в некротических и гипоксических участках опухоли фермент экспрессируется исключительно в опухоли. Таким образом, системно применяемое пролекарство метаболизируется до токсичного лекарственного средства только в опухоли. Было продемонстрировано, что это эффективно в отношении непатогенных анаэробов *Clostridium sporogenes*.

7. Ингибиторы киназ

Другая большая группа потенциальных мишеней для дополнительной терапии рака включает ингибиторы киназ, поскольку рост и выживание раковых клеток тесно связаны с нарушением регуляции активности киназы. Для восстановления нормальной активности киназы и, следовательно, уменьшения роста опухоли используется широкий спектр ингибиторов. Группа киназ для направленного воздействия включает рецепторные тирозинкиназы, например, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit, Flt-4, Flt3 дикого типа, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c- Met, RON, c- Ret, ALK, цитоплазматические тирозинкиназы, например, c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, серин/треониновые киназы, например, ATM, Aurora A и B, CDK, mTOR, PKCi, PLK, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 и липидкиназы, например, PI3K, SK1. Ингибиторы низкомолекулярных киназ представляют собой, например, PHA-739358, нилотиниб, дазатиниб и PD166326, NSC 743411, лапатиниб (GW-572016), канертиниб (CI-1033), семаксиниб (SU5416), ваталаниб (PTK787/ZK222584), сутент (SU11248), сорафениб (BAY 43- 9006) и лефлуномид (SU101). Для получения дополнительной информации см., например, Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39.

8. Toll-подобные рецепторы

Представители семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) являются важным связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, и эффект многих адъювантов зависит от активации TLR. Большое количество существующих вакцин против злокачественных опухолей включают лиганды TLR для усиления реакции на вакцину. Помимо TLR2, TLR3, TLR4, специально были исследованы TLR7 и TLR8 для лечения рака при подходах пассивной иммунотерапии. Близкородственные TLR7 и TLR8 способствуют противоопухолевым ответам, воздействуя на иммунные клетки, опухолевые клетки и микроокружение опухоли и могут активироваться структурами аналогов нуклеозидов. Все TLR использовались в качестве самостоятельных

иммунотерапевтических средств или адъювантов противоопухолевых вакцин и могут быть объединены с составами и способами настоящего изобретения. Для получения дополнительной информации см. van Duin et al. 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology*, 27(1):49-55.

9. Ингибиторы ангиогенеза

В дополнение к методам лечения, нацеленным на иммуномодулирующие рецепторы, на которые влияют опухолевые механизмы избегания и подавления иммунитета, существуют методы лечения, нацеленные на окружение опухоли. Ингибиторы ангиогенеза предотвращают обширный рост кровеносных сосудов (ангиогенез), необходимый опухолям для выживания. Например, ангиогенез, стимулируемый опухолевыми клетками для удовлетворения растущих потребностей в питательных веществах и кислороде, может быть заблокирован путем воздействия на различные молекулы. Неограничивающими примерами опосредующих ангиогенез молекул или ингибиторов ангиогенеза, которые можно комбинировать с настоящим изобретением, являются растворимый VEGF (изоформы VEGF VEGF121 и VEGF165, рецепторы VEGFR1, VEGFR2 и рецептор нейропилина-2 (NRP-2), ангиопоэтин 2, TSP-1 и TSP-2, ангиостатин и родственные молекулы, эндостатин, вазостатин, кальретикулин, фактор тромбоцитов-4, TIMP и CDAI, Meth-1 и Meth-2, IFN- α , - β и - γ , CXCL10, IL-4, -12 и -18, протромбин (kringle домен-2), фрагмент антитромбина III, пролактин, VEGI, SPARC, остеопонтин, маспин, канстатин, белок, родственный пролиферину, рестин и такие лекарственные средства, как, например, бевацизумаб, итраконазол, карбоксиамидотриазол, TNP-470, CM101, IFN- α , фактор тромбоцитов-4, сурамин, SU5416, тромбоспондин, антагонисты VEGFR, ангиостатические стероиды + гепарин, фактор ингибирования ангиогенеза хрящевого происхождения, ингибиторы матриксных металлопротеиназ, 2-метоксиэстрадиол, текогалан, тетратиомолибдат, талидомид, тромбоспондин, пролактин V β 3 ингибиторы, линомид, тасквинимод, обзор см., например, Schoenfeld and Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin.* (9):976-81.

10. Низкомолекулярные лекарственные средства для таргетной терапии

Низкомолекулярные лекарственные средства для таргетной терапии обычно являются ингибиторами ферментных доменов мутированных, сверхэкспрессируемых или иным образом критически важных белков внутри раковых клеток. Яркими и неограничивающими примерами являются ингибиторы тирозинкиназы иматиниб (Gleevec/Glivec) и гефитиниб (Iressa). Применение малых молекул, например, сунитиниб малата и/или сорафениб тозилата, воздействующие на некоторые киназы в сочетании с

вакцинами для терапии рака, также описаны в предыдущей патентной заявке US2009004213.

11. Вакцины на основе вирусов

Существует ряд вирусных противоопухолевых вакцин, доступных или находящихся в стадии разработки, которые можно использовать в комбинированном терапевтическом подходе вместе с составами настоящего изобретения. Одним из преимуществ применения таких вирусных векторов является их внутренняя способность инициировать иммунные реакции, при этом воспалительные реакции, возникающие в результате вирусной инфекции, создают сигнал опасности, необходимый для иммунной активации. Идеальный вирусный вектор должен быть безопасным и не должен вызывать антивекторный иммунный ответ, чтобы усилить специфические противоопухолевые реакции. Рекомбинантные вирусы, такие как вирусы коревой оспы, вирусы простого герпеса, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и вирусы птичьей оспы, использовались в моделях опухолей на животных, и на основе их обнадеживающих результатов были начаты клинические испытания на людях. Особенно важными вакцинами на основе вирусов являются вирусоподобные частицы (ВПЧ), небольшие частицы, содержащие определенные белки внешней оболочки вируса. Вирусоподобные частицы не содержат генетического материала вируса и не могут вызвать инфекцию, но их можно сконструировать так, чтобы они презентировали на своей оболочке опухолевые антигены. VLP могут быть получены из различных вирусов, таких как, например, вирус гепатита В или других семейств вирусов, включая Parvoviridae (например, аденоассоциированный вирус), Retroviridae (например, ВИЧ) и Flaviviridae (например, вирус гепатита С). Общий обзор см. в Sorensen and Thompson 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93; обзор вирусоподобных частиц против злокачественных опухолей рассмотрен в Buonaguro et al. 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83; и в Guillen et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2 (2), 128–133.

12. Мультиэпитопные стратегии

Применение мультиэпитопов показывает многообещающие результаты для вакцинации. Технологии быстрого секвенирования в сочетании с системами интеллектуальных алгоритмов позволяют использовать мутаном опухоли и могут обеспечить мультиэпитопы для персонализированных вакцин, которые можно комбинировать с настоящим изобретением. Для получения дополнительной информации

см. 2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J Immunother* 30: 762–772; кроме того, Castle et al. 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72 (5):1081-91.

13. Адоптивный перенос Т-клеток

Например, комбинация вакцинации опухолевым антигеном и переноса Т-клеток описана в: Rapoport et al. 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood* 117(3):788-97.

14. Таргетная терапия на основе пептидов

Пептиды могут связываться с рецепторами клеточной поверхности или пораженным внеклеточным матриксом, окружающим опухоль. Радионуклиды, присоединенные к этим пептидам (например, RGD), в конечном итоге убивают раковую клетку, если нуклид распадается вблизи клетки. Особый интерес представляют олиго- или мультимеры этих связывающих мотивов, поскольку это может привести к повышению опухолевой специфичности и авидности. Неограничивающие примеры см. в Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. *Nihon Rinsho* 69(9): 1657-61.

15. Другие методы лечения

Существует множество других методов лечения рака, которые можно комбинировать с препаратами и способами настоящего изобретения для создания синергических эффектов. Неограничивающими примерами являются методы лечения, направленные на апоптоз, гипертермию, гормональную терапию, теломеразную терапию, терапию потенцирования инсулина, генную терапию и фотодинамическую терапию.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение связывающих агентов, содержащих связывающие домены со специфичностью к CLDN18.2 и CD3

Мы исследовали возможность использования связывающих агентов, содержащих связывающие домены со специфичностью к CLDN18.2 и CD3 (биспецифические анти-CLDN18.2 x анти-CD3 антитела, бсАт), для перенаправления эффекторных Т-клеток CD3+ на разрушение клеточных линий, экспрессирующих CLDN18.2. Несколько анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт были созданы с использованием антигенсвязывающего домена (АСД) мышинового антитела против CLDN18.2 (SEQ ID NO: 38 и 41) (см. WO

2007/059997). Кроме того, использовали несколько последовательностей scFv против CD3, имеющих различные аффинности к CD3. В следующей таблице 2 представлен обзор бсАт, несущих мышиные CLDN18.2 АСД и CD3 АСД.

Таблица 2: Обзор бсАт, несущих мышиные CLDN18.2 АСД и CD3 АСД

бсАт	Первая цепь, SEQ ID NO:	Вторая цепь, SEQ ID NO:	Третья цепь*, SEQ ID NO:	Аффинность связывания с CD3
XENP24645	79	80	81	высокая (High)
XENP24646	79	82	81	высокая/средняя (HighInt#1)
XENP24647	79	83	81	высокая (High)
XENP24648	79	84	81	высокая/средняя (HighInt#1)
XENP24649	79	85	81	средняя (Int)

*бсАт, бивалентно связывающиеся с CLDN18.2, содержат четвертую цепь, идентичную третьей цепи

Пример 1А: Получение анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт

Схематические изображения анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт изображены на фигуре 1.

ДНК, кодирующую VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2), генерировали путем синтеза генов и субклонировали в экспрессирующий вектор рТТ5, содержащий подходящих партнеров слияния (например, константные области или scFv-Fc анти-CD3). ДНК, кодирующую тяжелые цепи анти-CD3 scFv-Fc, получали путем синтеза генов. ДНК трансфицировали в клетки HEK293E для экспрессии. В качестве контроля также получали биспецифическое анти-RSV х анти-CD3 антитело (SEQ ID NO: 93, 94, 95).

Пример 1В: Связывание и перенаправленная цитотоксичность Т-клеток на клеточных линиях NUGC-4 и KP-4 с помощью анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт

NUGC-4 представляет собой линию клеток карциномы желудка, экспрессирующую высокие уровни CLDN18.2, а KP-4 представляет собой линию клеток карциномы поджелудочной железы, экспрессирующую очень низкие уровни CLDN18.2 (сравнимо с линией клеток CLDN18.2-негативного контроля). Соответственно, мы исследовали связывание и перенаправленную Т-клеточную цитотоксичность (RTCC) на клеточных линиях NUGC-4 и KP-4, опосредованную анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт, а также контрольным анти-RSV х анти-CD3 бсАт.

200000 клеток (либо NUGC-4, либо KP-4) инкубировали с указанными концентрациями анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт в течение часа на льду. Затем образцы промывали и окрашивали F(ab')₂-фрагментом козьего антитела против IgG человека Alexa Fluor® 647 AffiniPure, вторичным антителом, специфичным к фрагменту Fcγ (Jackson

ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания) в течение часа на льду. Образцы снова промывали и анализировали проточной цитометрией. Данные, показывающие связывание с клетками KP-4 и NUGC-4, представлены на фигуре 2.

Для исследования RTCC, опосредованного анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт, NUGC-4 или KP-4 инкубировали с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1) и определяли концентрации анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт в течение 24 часов при 37°C. RTCC определяли с помощью анализа целостности гомогенной мембраны CytoTox-ONE™ (Promega, Мэдисон, Висконсин) для измерения уровней лактатдегидрогеназы в соответствии с инструкциями производителя, а данные получали с помощью устройства для считывания микропланшетов Wallac Victor2 (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс), см. фигуру 3.

В совокупности данные показывают, что при всех протестированных концентрациях анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт дозозависимо связывались с клетками NUGC-4, в то время как связывание с клетками KP-4 практически не обнаруживалось. Примечательно, что бсАт формата «Fab2-scFv» (т.е. XENP24647, XENP24648 и XENP24649) гораздо более эффективно связываются с клетками NUGC-4, чем бсАт формата «Fab-scFv» (т.е. XENP24645 и XENP24646). Вероятно, это связано с повышенной авидностью, которую имеет формат «Fab2-scFv». Данные, согласующиеся со связыванием с клетками, показывают, что анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт дозозависимо индуцируют RTCC на NUGC-4, в то время как RTCC не индуцируется на клетках KP-4.

Пример 1С: Дальнейшая характеристика анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт с использованием клеток NUGC-4 и SNU-601

(а) Идентификация SNU-601 как клеточной линии, экспрессирующей CLDN18.2

Чтобы лучше охарактеризовать анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт по настоящему изобретению, мы попытались идентифицировать клеточные линии с более высокими уровнями экспрессии CLDN18.2 по сравнению с экспрессией NUGC-4. Мы исследовали связывание XENP24647 с различными клеточными линиями с помощью проточной цитометрии следующим образом. 200000 клеток из различных клеточных линий (и клетки Ramos в качестве отрицательного контроля) инкубировали с XENP24647 в течение часа на льду с последующим окрашиванием F(ab')₂-фрагментом козьего антитела против IgG человека Alexa Fluor® 647 AffiniPure, вторичным антителом, специфичным к фрагменту Fcγ (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания) в течение часа на льду и анализировали с помощью проточной цитометрии. На фигуре 4 показано связывание XENP24647 с NUGC-4 и SNU-601. Данные показывают, что SNU-601 экспрессирует более высокие уровни CLDN18.2 по сравнению с NUGC-4. Соответственно, мы дополнительно

охарактеризовали анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт, используя клетки NUGC-4 и SNU-601.

(б) Связывание анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт на клетках NUGC-4 и SNU-601

Мы исследовали связывание анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт на клетках NUGC-4 и SNU-601. Эксперименты проводили, как описано выше. В частности, 200000 клеток из различных клеточных линий (и клетки Ramos в качестве отрицательного контроля) инкубировали с указанными концентрациями указанных бсАт в течение часа на льду с последующим окрашиванием F(ab')₂-фрагментом козьего антитела против IgG человека Alexa Fluor® 647 AffiniPure, вторичным антителом, специфичным к фрагменту Fcγ (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания) в течение часа на льду и анализировали с помощью проточной цитометрии. PE MFI, указывающий на связывание бсАт к NUGC-4 и SNU-601, изображены на фигуре 5. Каждое из бсАт дозозависимо связывалось как с NUGC-4, так и с SNU-601, с более высоким максимальным связыванием с клетками SNU-601, чем с NUGC-4, что согласуется с соответствующими уровнями экспрессии CLDN18.2 в каждой клеточной линии. В соответствии с результатами примера 1B, приведенными выше, данные показывают, что бсАт в формате «Fab2-scFv» связывают клетки более эффективно, чем бсАт в формате «Fab-scFv».

(с) Индукция перенаправленной цитотоксичности Т-клеток на клетках NUGC-4 и SNU-601 с помощью анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт

Затем мы исследовали RTCC, опосредованную анти-CLDN18.2 x анти-CD3 бсАт на NUGC-4 и SNU-601. Эксперименты проводили, как описано выше. В частности, клетки NUGC-4 или SNU-601 инкубировали с МКПК человека (соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням 20:1) и определяли концентрации указанных бсАт и анти-CD107a-BV421 в течение 24 часов или 48 часов при 37°C. В качестве контроля использовали только клетки-мишени или клетки-мишени и эффекторные клетки без бсАт. После инкубации образцы окрашивали в течение 1 часа на льду следующими антителами: анти-CD69-PE, анти-CD25-APC, анти-CD4-APC-Fire750 и анти-CD8-BV605. Затем клетки окрашивали аннексином-V BUV395 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния) и раствором для окрашивания жизнеспособности 7-AAD (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния). Наконец, клетки анализировали проточной цитометрией.

Связывание аннексина V и 7AAD является индикатором индукции апоптоза. Соответственно, живые клетки представляли собой АннексинV-7AAD-, тогда как мертвые клетки представляли собой сумму АннексинV+, 7AAD+ и АннексинV+7AAD+ клеток. Данные, отражающие количество мертвых/умирающих клеток-мишеней и живых клеток-мишеней после инкубации с эффекторными клетками и указанными бсАт, показаны на

фигурах 6-9. Данные показывают, что бсАт усиливают уничтожение клеток-мишеней (т.е. клеток NUGC-4 и SNU-601), на что указывает увеличение количества мертвых/умирающих клеток, а также уменьшение количества живых клеток. Примечательно, что данные показывают, что связывающие домены с более высокой аффинностью к CD3 усиливают RTCC (например, при сравнении XENP24645 и XENP24646; и при сравнении XENP24647 и XENP24649). Кроме того, в случае бсАт, имеющих один и тот же связывающий домен со специфичностью к CD3, бсАт в формате «Fab2-scFv» усиливают RTCC более эффективно, чем бсАт в формате «Fab-scFv» (например, при сравнении XENP24647 и XENP24645). Кроме того, улучшенный RTCC с помощью бсАт «Fab2-scFv» по сравнению с бсАт «Fab-scFv» (например, XENP24645 (формат Fab-scFv) и XENP24647 (формат Fab2-scFv), имеющих такую же аффинность к CD3) более выражен в SNU-601, который экспрессирует более высокие уровни CLDN18.2, что позволяет предположить, что формат «Fab2-scFv» обеспечивает селективность в отношении клеточных линий, экспрессирующих более высокие уровни CLDN18.2.

Мы также исследовали активацию Т-клеток бсАт по изобретению. CD69 является маркером ранней активации, а CD25 является маркером поздней активации, оба из которых активируются после активации Т-клеток посредством передачи сигналов TCR. CD107a является функциональным маркером дегрануляции Т-клеток и цитотоксической активности. Эффекторные клетки подвергали гейтингу для идентификации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Затем Т-клетки подвергали гейтингу на предмет экспрессии CD69, CD25 и CD107a. Данные, демонстрирующие активацию маркеров на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, представлены на фигурах 10-13. Данные показывают тенденцию, соответствующую результатам RTCC. Например, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентного связывания CLDN18.2 усиливает активацию и дегрануляцию Т-клеток.

Пример 2. Получение анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт, имеющих гуманизированные антигенсвязывающие домены CLDN18.2

Были созданы бсАт, несущие гуманизированные АСД со специфичностью к CLDN18.2. В следующей таблице 3 представлен обзор созданных гуманизированных бсАт.

Таблица 3: Обзор бсАт, несущих гуманизированные АСД со специфичностью к CLDN18.2

бсАт	Первая цепь, SEQ ID NO:	Вторая цепь, SEQ ID NO:	Третья цепь*, SEQ ID NO:	Аффинность связывания с CD3
XENP29472	73	75	78	высокая (High)
XENP29473	86	87	78	высокая (High)
XENP29474	73	91	78	высокая/средняя (HighInt#1)

XENP29475	86	88	78	высокая/средняя (HighInt#1)
XENP29476	73	92	78	высокая (High)
XENP29477	86	89	78	высокая (High)
XENP29478	73	76	78	высокий/средний (HighInt#1)
XENP29479	86	90	78	высокая/средняя (HighInt#1)

*бсАт, бивалентно связывающиеся с CLDN18.2, содержат четвертую цепь, идентичную третьей цепи

Пример 2А: Гуманизация антигенсвязывающих доменов CLDN18.2

Мы разработали моноклональные антитела против CLDN18.2, имеющие гуманизированные переменные области, используя оптимизацию содержимого строки (см., например, WO 2005/056759 и патент США № 7657380) (VH: SEQ ID NO: 39, 40, VL: SEQ ID NO: 42). Идентичность зародышевой линии человека увеличилась с 73,2% для мышиного АСД (SEQ ID NO: 38, 41; «H0L0») до 86,6% (SEQ ID NO: 40, 42; «H2L1») и 88,3% (SEQ ID NO: 39), 42; «H1L1»), соответственно, для двух вариантов. Переменные области гуманизированных моноклональных антител использовали для создания дополнительных анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт как в формате «Fab-scFv», так и в формате «Fab2-scFv», как описано в примере 1А.

Пример 2В: Гуманизация CLDN18.2 АСД сохранила связывание, RTCC и активацию Т-клеток

Затем мы сравнили клеточное связывание, индукцию RTCC и индукцию активации Т-клеток анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт, имеющими мышиные CLDN18.2 АСД, с бсАт, содержащими гуманизированные CLDN18.2 АСД.

Как видно на фигуре 4, хотя клеточная линия SNU-601 характеризовалась более высокими уровнями экспрессии CLDN18.2, чем клеточная линия NUGC-4, популяция клеток SNU-601 была очень гетерогенной по экспрессии CLDN18.2. Соответственно, с помощью проточной цитометрии мы отсортировали клетки SNU-601 на основе экспрессии CLDN18.2 и увеличили популяцию CLDN18.2+ в течение 4 дней. Размноженную популяцию CLDN18.2+ (называемую в данной заявке обогащенным SNU-601 или SNU-601(2E4)) повторно оценивали по экспрессии CLDN18.2, как описано в примере 1С, и сравнивали с необогащенными клетками SNU-601, см. фигуру 14. Данные показывают, что SNU-601(2E4) содержит существенно более высокую популяцию CLDN18.2+ клеток. Эксперименты в этом разделе проводили с использованием клеток SNU-601(2E4).

Связывание бсАт, содержащих гуманизированные CLDN18.2 АСД, с клетками SNU-601(2E4) оценивали, как описано в примере 1В. В частности, 200000 клеток SNU-

601(2E4) инкубировали с указанными концентрациями указанных бсАт в течение часа на льду. Затем образцы окрашивали F(ab')₂-фрагментом козьего антитела против IgG человека Alexa Fluor® 647 AffiniPure, вторичным антителом, специфичным к фрагменту Fcγ (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, Пенсильвания), и анализировали с помощью проточной цитометрии. Контрольные образцы включали бсАт, содержащие мышинные CLDN18.2 АСД, двухвалентные мАт против CLDN18.2, только клетки и только вторичные антитела. AlexaF657 MFI, указывающий на связывание бсАт, изображен на фигуре 15. Данные показывают, что бсАт, содержащие гуманизированные CLDN18.2 АСД, имели такое же связывание с клетками SNU-601(2E4), что и бсАт, содержащие мышинные CLDN18.2 АСД, что указывает на то, что гуманизация сохранила эффективность связывания бсАт. Примечательно, что бсАт в формате «Fab2-scFv» продемонстрировали сходное связывание по сравнению с двухвалентными моноклональными анти-CLDN18.2 антителами. Кроме того, данные показывают, что бсАт, содержащие гуманизированные VH и VL согласно SEQ ID NO: 39 и 42 (H1L1) (например, XENP29472, XENP29474, XENP29476 и XENP29478), лучше сохраняют связывание, чем бсАт, содержащие гуманизированные VH и VL согласно SEQ ID NO: 40 и 42 (H2L1) (например, XENP29473, XENP29475, XENP29477 и XENP29479).

Затем мы исследовали индукцию RTCC на клетках SNU-601(2E4) и активацию Т-клеток с помощью бсАт, имеющих гуманизированные CLDN18.2 АСД. Клетки SNU-601(2E4) метили с помощью набора для пролиферации клеток CellTrace™ CFSE (ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Меченные CFSE клетки SNU-601(2E4) инкубировали с МКПК человека (соотношение эффектора к мишени 10:1) и анти-CD107a-BV421 в течение 24 часов при 37°C. После инкубации надосадочную жидкость собирали для анализа цитокинов с помощью набора V-PLEX Proflaming Panel 1 Human Kit (в соответствии с протоколом производителя: Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд) и клетки окрашивали красителем Aqua Zombie в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали и окрашивали антителами, окрашивающими анти-CD4-APC-Cy7, анти-CD8-perCP-Cy5.5 и анти-CD69-APC, и анализировали с помощью проточной цитометрии. Мы использовали два разных подхода для исследования индукции RTCC: а) уменьшение количества клеток-мишеней CSFE⁺ (см. фигуру 15A) и б) окрашивание Zombie Aqua на клетках-мишенях CSFE⁺ (см. фигуры 15B, C). Мы также исследовали активацию и дегрануляцию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на основе экспрессии CD69 и CD107a (см. Фигуры 16–20). Наконец, мы исследовали секрецию IFNγ и TNFα Т-клетками, см. фигуру 21. В соответствии с данными по связыванию, гуманизация сохранила индукцию RTCC и активации Т-клеток, а также секрецию цитокинов бсАт,

имеющих гуманизированные CLDN18.2 АСД. Что в значительной степени согласуется с примером 1С, более высокая аффинность связывания CD3 и/или двухвалентного связывания CLDN18.2 усиливает эффективность RTCC, а также активацию Т-клеток, дегрануляцию и секрецию цитокинов.

Пример 3: Дальнейшая характеристика анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт

В следующей таблице 4 представлен обзор других полученных и протестированных бсАт.

Таблица 4: Обзор других бсАт

бсАт	Первая цепь, SEQ ID NO:	Вторая цепь, SEQ ID NO:	Третья цепь*, SEQ ID NO:
XENP31726	73	74	78
XENP32461	73	77	78

*бсАт, бивалентно связывающиеся с CLDN18.2, содержат четвертую цепь, идентичную третьей цепи

Пример 3А: анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт перекрестно реагируют на CLDN18.2 яванского макака и мыши

Для облегчения клинической разработки (например, путем исследования терапевтических средств на модельных животных) полезно, чтобы бсАт были перекрестно реагирующими на CLDN18.2 мышей и/или яванских макаков. Поэтому анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт исследовали на предмет их связывания с CLDN18.2 человека, CLDN18.2 яванского макака и CLDN18.2 мыши. Клетки HEK293 временно трансфицировали для экспрессии CLDN18.2 человека, яванского макака или мыши. Через 48 часов после трансфекции клетки смешивали с указанными концентрациями бсАт и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Клетки промывали, а затем окрашивали вторичными антителами в течение 1 часа при 4°C. После еще двух промываний клетки анализировали на проточном цитометре Attune. Данные, представленные на фигурах 22 и 23, показывают, что анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт дозозависимо связывались с клетками, трансфицированными каждым из CLDN18.2 человека, яванского макака и мыши. Примечательно, что бсАт формата «Fab2-scFv» (т.е. XENP24647 и XENP29476) гораздо более эффективно связывались с клетками, трансфицированными CLDN18.2, по сравнению с бсАт формата «Fab-scFv» (т.е. XENP24645 и XENP29472) и имели аналогичную эффективность в формате бивалентного моноклонального антитела (т.е. XENP24644).

Пример 3В: Анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт не демонстрируют нецелевой реактивности

Чтобы убедиться в отсутствии нецелевой реактивности, связывание бсАт по настоящему изобретению с CLDN18.1 человека, яванского макака и мыши и CLDN9

человека исследовали, как в целом описано выше, за исключением HEK293, временно трансфицированного для экспрессии CLDN18.1 человека, яванского макака или мыши или CLDN9 человека. Данные, представленные на фигуре 24, показывают, что анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт не продемонстрировали какой-либо нецелевой реактивности.

Пример 3С: анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт демонстрируют диапазон активности RTCC

Для ранжирования активности анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт исследовали уничтожение клеток-мишеней NUGC4 с помощью бсАт и контрольного бсАт (AMG 910; SEQ ID NO: 132 из WO 2020/025792). Клетки-мишени NUGC4 были помечены CFSE и восстановлены в течение ночи при 37°C. Затем клетки NUGC4 инкубировали с эффекторными клетками (разные доноры для каждого эксперимента) при соотношении эффектор:мишень 10:1 и указывали концентрации антител в течение 48 часов. Клетки окрашивали для дифференциации живых/мертвых клеток, окрашивали анти-CD4-APC-Fire750, анти-CD8-PerCP-Cy5.5, анти-CD107a-BV421 и анти-CD69-BV785 для дифференциации активации Т-клеток на различных популяциях Т-клеток и анализировали на проточном цитометре Symphony. Данные, представленные на фигуре 25, показывают, что бсАт эффективно индуцируют RTCC. БсАт можно ранжировать в соответствии с их активностью RTCC следующим образом: XENP31726 (наиболее эффективный) > XENP32461 > XENP29478 > XENP29472 (наименее эффективный). Примечательно, что XENP32461 индуцировал RTCC с такой же эффективностью, как и биспецифическое антитело сравнения, а XENP31726 индуцировал RTCC с повышенной эффективностью по сравнению с биспецифическим антителом сравнения.

Пример 3D: Характеризация индукции RTCC *in vitro* на клеточных линиях, экспрессирующих различные плотности антигена CLDN18.2

Анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт исследовали на предмет активности уничтожения клеток на клетках, имеющих различную плотность CLDN18.2. В первой серии экспериментов клетки-мишени BxPc3 (600 тыс. сайтов связывания CLDN18.2), GSU (70 тыс. сайтов связывания CLDN18.2), NUGC4 (50 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и KatoIII (30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) метили CFSE и высевали по ~10 тыс. клеток на лунку в 100 мкл аналитической среды (RPMI1640/10%ФБС) в 96-луночный культуральный планшет с плоским дном для восстановления в течение ночи при 37°C. Эффекторные клетки выделяли из МКПК человека и инкубировали с клетками-мишенями при соотношении эффектор:мишень 10:1 и указанных концентрациях бсАт. После 48-часовой инкубации клетки окрашивали с помощью набора для окрашивания живых/мертвых мертвых клеток синим (1:1000) в ФБС при комнатной температуре в

течение 30 минут. Затем образцы промывали 1х буфером FACS. Клетки окрашивали анти-CD4-APC-Fire750, анти-CD8-PerCP-Cy5.5, анти-CD107a-BV421 и анти-CD69-BV785, снова промывали ледяным ФСБ и ресуспендировали в 90 мкл буфера FACS. Данные были получены с помощью FACS Fortessa в фиксированном объеме (60 мкл). Данные, отражающие индукцию RTCC, активацию Т-клеток и секрецию цитокинов, представлены на фигурах 26-33. В соответствии с данными примера 3С, данные показывают, что XENP31726 и XENP32461 (а также дополнительные бсАт XENP31724 и XENP29476) индуцируют RTCC более эффективно по сравнению с XENP29478 и XENP29472 (а также дополнительными бсАт XENP29474).

В другой серии экспериментов исследовали активность при более низком соотношении эффектор:мишень, равном 3:1. Клетки-мишени KatoIII (30 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) и HGC27-4H2 (20 тыс. сайтов связывания CLDN18.2) метили CSFE и высевали в 100 мкл среды для анализа (RPMI1640/10%ФБС) в 96-луночный культуральный планшет с плоским дном для восстановления в течение ночи при 37°C. Эффекторные клетки выделяли из МКПК человека и инкубировали с клетками-мишенями при соотношении эффектор:мишень 3:1 и указанных концентрациях бсАт. После 24 часов инкубации клетки окрашивали с помощью набора для окрашивания живых/мертвых мертвых клеток синим (1:1000) в ФСБ при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем образцы промывали 1х буфером FACS. Клетки окрашивали анти-CD4-APC-Fire750, анти-CD8-PerCP-Cy5.5, анти-CD107a-BV421 и анти-CD69-BV785, снова промывали ледяным ФСБ и ресуспендировали в 90 мкл буфера FACS. Данные были получены с помощью FACS Fortessa в фиксированном объеме (60 мкл). Данные, отражающие индукцию RTCC, активацию Т-клеток и секрецию цитокинов, представлены на фигурах 34-36.

В последнем эксперименте активность при еще более низком соотношении эффектор:мишень, равном 1:1, исследовали, как в целом описано выше, с использованием клеток-мишеней KatoIII. Данные изображены на фигуре 37. Данные показывают, что тестируемые бсАт эффективно индуцируют RTCC и уничтожение клеток-мишеней на раковых клетках, экспрессирующих CLDN18.2.

Пример 4. Противоопухолевый эффект ASP2138 (XENP31726) в модели несущих опухоли NUGC-4 10сF7_5_3E10 мышей NOG с трансплантированными МКПК человека

Исследовали влияние анти-CLDN18.2 х анти-CD3 бсАт ASP2138 (XENP31726) на рост опухоли NUGC-4 10сF7_5_3E10 в модели мышей NOG с привитыми опухолевыми моноклеарными клетками периферической крови человека (МКПК). Внутривентральное введение ASP2138 один раз в неделю в течение 14 дней вызывало значительное угнетение

роста опухолей NUGC-4 10cF7_5_3E10 в дозах 1, 3 и 10 мг/кг на 60%, 91% и 99%, соответственно, без потери массы тела. Кроме того, у 1 из 10 мышей в группе, получавшей 3 мг/кг, была достигнута полная регрессия опухоли.

Это исследование продемонстрировало, что ASP2138 проявляет противоопухолевый эффект в отношении рака желудка, экспрессирующего клаудин18.2 человека, на модели мышей NOG с трансплантированными МКПК человека.

Пример 4А: Материалы и методы

(a) Антитело

ASP2138 (Лот № DSP20804; Astellas Pharma Inc., Токио, Япония) перед введением растворяли в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

(b) Клеточная линия

NUGC-4 10cF7_5_3E10, субклон линии раковых клеток желудка NUGC-4, эндогенно экспрессирующий человеческий клаудин18.2, получили от Ganymed Pharmaceuticals AG (Майнц, Германия) и культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, инактивированной нагреванием, и 1 % глутамакса при 37°C в 5% CO₂.

(в) Животные

Шестинедельные самки мышей NOG были приобретены у In-Vivo Science Inc. (Токио, Япония). Это исследование было одобрено Институциональным комитетом по уходу и использованию животных компании Astellas Pharma Inc., Исследовательского центра Цукуба, аккредитованного AAALAC International.

(d) Инъекция МКПК человека и инокуляция опухоли

Человеческие МКПК (Precision for Medicine, 93000-10M) суспендировали в ФСБ в концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл и внутривенно вводили 7-недельным мышам в концентрации 5×10^6 клеток/200 мкл/мышь. Через неделю после инъекции человеческих МКПК клетки NUGC-4 10cF7_5_3E10 суспендировали в ФСБ в концентрации 1×10^7 клеток/мл и подкожно инокулировали в бок 8-недельных мышей в концентрации 1×10^6 клеток/100 мкл/мышь и давали возможность расти.

(e) Введение и измерение

Через восемь дней после инокуляции клеток NUGC-4 10cF7_5_3E10 мышей распределяли по группам с одинаковыми средними объемами опухолей ($n = 10$). Затем было начато введение ASP2138. Первый день введения определяли как день 0. Мышам внутрибрюшинно вводили ФСБ или ASP2138 (0,1, 1, 3 и 10 мг/кг) в день 0 и день 7. Диаметры опухолей и массу тела измеряли на 0, 3, 7, 10 и 14 день с использованием штангенциркуля и весов, соответственно. Объем опухоли [мм³] определяли по формуле:

$(\text{Длина длинной оси опухоли [мм]}) \times (\text{Длина короткой оси опухоли [мм]})^2 \times 0,5.$

Процент ингибирования роста опухоли (% Inh) рассчитывали по следующей формуле:

$\% \text{ Inh} = 100 \times (1 - [\text{средний объем опухоли на день 14} - \text{средний объем опухоли на день 0}] \text{ в каждой группе} \div [\text{средний объем опухоли на день 14} - \text{средний объем опухоли на день 0}] \text{ в группе, получавшей ФСБ}).$

(е) Статистический анализ

Значения выражаются как средние значения $\pm$ стандартные ошибки среднего значения (SEM) для объема опухоли и массы тела. Средние объемы опухолей и массы тела на 14-й день в группах, получавших ASP2138, сравнивали с таковыми в группе, получавшей ФСБ, с использованием критерия множественного сравнения Даннетта. $P < 0,05$ считались статистически значимыми. Для обработки данных использовались GraphPad Prism (версия 8.0.2, GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США) и Microsoft Excel (версия 2002, Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, США).

Пример 4В: Результаты и заключение

Внутрибрюшинное введение ASP2138 один раз в неделю в течение 14 дней вызывало значительное ингибирование роста опухолей NUGC-4 10сF7_5_3E10 в дозах 1, 3 и 10 мг/кг на 60%, 91% и 99%, соответственно, в мышинной модели NOG с привитыми МКПК человека (фигура 38). Кроме того, у 1 из 10 мышей в группе, получавшей 3 мг/кг, была достигнута полная регрессия опухоли. На массу тела мышей, получавших ASP2138, не влияла ни одна тестируемая доза (фиг. 38).

Это исследование продемонстрировало, что ASP2138 проявляет противоопухолевый эффект при раке желудка человека на модели мышей NOG с трансплантированными МКПК человека. Отличные противоопухолевые эффекты *in vivo* были продемонстрированы для всех протестированных концентраций бсАт.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3,

при этом связывающий агент содержит по меньшей мере три полипептидные цепи, где

(i) первая полипептидная цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH), полученную из иммуноглобулина, специфичного к CLDN18.2 (VH(CLDN18.2)),

(ii) вторая полипептидная цепь содержит VH, полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VH(CD3)) и вариабельную область легкой цепи (VL), полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VL(CD3)), и

(iii) третья полипептидная цепь содержит VL, полученную из иммуноглобулина, специфичного к CLDN18.2 (VL(CLDN18.2)).

2. Связывающий агент по п. 1, отличающийся тем, что первая полипептидная цепь содержит константную область 1 тяжелой цепи (CH1), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта.

3. Связывающий агент по п. 1 или 2, отличающийся тем, что первая и вторая полипептидные цепи содержат константную область 2 тяжелой цепи (CH2), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта, и константную область 3 тяжелой цепи (CH3), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта.

4. Связывающий агент по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что третья полипептидная цепь содержит константную область легкой цепи (CL), полученную из иммуноглобулина или его функционального варианта.

5. Связывающий агент по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что иммуноглобулин представляет собой IgG1.

6. Связывающий агент по п. 5, отличающийся тем, что IgG1 представляет собой IgG1 человека.

7. Связывающий агент по любому из пп. 3-6, отличающийся тем, что VH и CH1, CH2 и CH3 на первой полипептидной цепи расположены от N-конца к С-концу в порядке VH(CLDN18.2)-CH1-CH2-CH3.

8. Связывающий агент по любому из пп. 3-7, отличающийся тем, что VH, VL и CH2 и CH3 на второй полипептидной цепи расположены от N-конца к С-концу в порядке VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3.

9. Связывающий агент по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью.

10. Связывающий агент по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2) и VL(CLDN18.2) взаимодействуют с образованием связывающего домена со специфичностью к CLDN18.2, а VH(CD3) и VL (CD3) взаимодействуют с образованием связывающего домена, специфичного к CD3.

11. Связывающий агент по любому из пп. 3-10, отличающийся тем, что CH2 в первой полипептидной цепи взаимодействует с CH2 во второй полипептидной цепи и/или CH3 в первой полипептидной цепи взаимодействует с CH3 во второй полипептидной цепи.

12. Связывающий агент по любому из пп. 4-11, отличающийся тем, что CH1 в первой полипептидной цепи взаимодействует с CL в третьей полипептидной цепи.

13. Связывающий агент по любому из пп. 1-12, содержащий дополнительный связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2, при этом вторая полипептидная цепь дополнительно содержит VH(CLDN18.2) и при этом связывающий агент содержит четвертую полипептидную цепь, идентичную третьей полипептидной цепи.

14. Связывающий агент по п. 13, отличающийся тем, что вторая полипептидная цепь дополнительно содержит CH1, полученный из иммуноглобулина или его функционального варианта.

15. Связывающий агент по п. 14, отличающийся тем, что иммуноглобулин представляет собой IgG1.

16. Связывающий агент по п. 15, отличающийся тем, что IgG1 представляет собой IgG1 человека.

17. Связывающий агент по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что VH, VL и CH1, CH2 и CH3 на второй полипептидной цепи расположены от N-конца к С-концу в порядке

VH(CLDN18.2)-CH1-VH(CD3)-VL(CD3)-CH2-CH3 или

VH(CLDN18.2)-CH1-VL(CD3)-VH(CD3)-CH2-CH3.

18. Связывающий агент по любому из пп. 13-17, отличающийся тем, что вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

19. Связывающий агент по любому из пп. 13-18, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2) на второй полипептидной цепи взаимодействует с VL(CLDN18.2) на четвертой полипептидной цепи с образованием дополнительного связывающего домена со специфичностью к CLDN18. 2.

20. Связывающий агент по любому из пп. 14-19, отличающийся тем, что CH1 на второй полипептидной цепи взаимодействует с CL на четвертой полипептидной цепи.

21. Связывающий агент по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 и 61.

22. Связывающий агент по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что VH(CD3) содержит

(i) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKANNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 50) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант,

(ii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDEYVSWFAY (SEQ ID NO: 51) или ее функциональный вариант, или

(iii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант.

23. Связывающий агент по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55.

24. Связывающий агент по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что VL(CD3) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 46) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 46). ID NO: 47) или его функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 48) или его функциональный вариант.

25. Связывающий агент по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39.

26. Связывающий агент по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 32) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую

аминокислотную последовательность NIYPSDSYTNYNQKFQG. (SEQ ID NO: 33) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SWRGNSFDY (SEQ ID NO: 34) или ее функциональный вариант.

27. Связывающий агент по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42.

28. Связывающий агент по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что VL(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KSSQSLLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 35) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 36) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNDYSPFT (SEQ ID NO: 37) или ее функциональный вариант.

29. Связывающий агент по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что

(i) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 58, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, а VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42,

(ii) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 61, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, и VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42, или

(iii) VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 54, VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55, VH (CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 39, а VL(CLDN18.2) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 42.

30. Связывающий агент по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что

VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 58, или ее функционального варианта,

VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта,

VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или

VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42, или ее функционального варианта.

31. Связывающий агент по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что

VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 61, или ее функционального варианта,

VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта,

VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или

VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42, или ее функционального варианта.

32. Связывающий агент по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что

VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 54, или ее функционального варианта,

VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта,

VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или

VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42, или ее функционального варианта.

33. Связывающий агент по любому из пп. 3-32, отличающийся тем, что в первой полипептидной цепи CH1 соединен с CH2 пептидным линкером.

34. Связывающий агент по п. 33, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 27) или ее функциональный вариант.

35. Связывающий агент по любому из пп. 3-34, отличающийся тем, что VH(CD3) или VL(CD3) соединены с CH2 посредством пептидного линкера.

36. Связывающий агент по любому из пп. 14-35, отличающийся тем, что VH(CD3) или VL(CD3) соединены с CH1 посредством пептидного линкера.

37. Связывающий агент по п. 35 или 36, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (G4S)_x или ее функциональный вариант, где x равно 2, 3, 4, 5 или 6.

38. Связывающий агент по п. 37, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (G4S)₂ (SEQ ID NO: 26) или ее функциональный вариант.

39. Связывающий агент по любому из пп. 35-38, отличающийся тем, что пептидный линкер, соединяющий VH(CD3) или VL(CD3) и CH2, включает аминокислотную последовательность KTHTCPPCP (SEQ ID NO: 21) или ее функциональный вариант.

40. Связывающий агент по п. 39, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (G4S)2KTHTCPPCP (SEQ ID NO: 23) или ее функциональный вариант.

41. Связывающий агент по п. 39, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 22) или ее функциональный вариант.

42. Связывающий агент по любому из пп. 1-41, отличающийся тем, что VH(CD3) и VL(CD3) соединены друг с другом посредством пептидного линкера.

43. Связывающий агент по п. 42, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (GKPGS)*x* или ее функциональный вариант, где *x* равно 2, 3, 4, 5 или 6.

44. Связывающий агент по п. 43, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 11) или ее функциональный вариант.

45. Связывающий агент по любому из пп. 2-44, отличающийся тем, что CH1 включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток аспарагиновой кислоты в положении 208 согласно нумерации EU.

46. Связывающий агент по любому из пп. 14-45, отличающийся тем, что CH1 в первой полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток аспарагиновой кислоты в положении 208 согласно нумерации EU, а CH1 во второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащий остаток аспарагина в положении 208 согласно нумерации EU.

47. Связывающий агент по любому из пп. 1-46, который по существу не связывается с FcγRI, Па, Пб и/или Пга человека.

48. Связывающий агент по любому из пп. 3-47, отличающийся тем, что CH2 в первой и/или второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую одно или более из следующих: остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делеция в положении 236, остаток лизина в положении 267 и остаток глутаминовой кислоты в положении 295 согласно нумерации EU.

49. Связывающий агент по п. 48, отличающийся тем, что CH2 в первой и второй полипептидной цепи содержат аминокислотную последовательность, содержащую остаток пролина в положении 233, остаток валина в положении 234, остаток аланина в положении 235, делецию в положении 236 и остаток лизина в положении 267 согласно нумерации EU, причем CH2 в первой полипептидной цепи дополнительно содержит

остаток глутаминовой кислоты в положении 295 согласно нумерации EU, а CH₂ во второй полипептидной цепи дополнительно содержит остаток глутамина в положении 295 согласно нумерации EU.

50. Связывающий агент по любому из пп. 3-49, отличающийся тем, что CH₃ в первой и/или второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую одно или более из следующего: остаток глутамина в положении 357, остаток лизина в положении 364, остаток аспарагиновой кислоты в положении 368, остаток серина в положении 370, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 согласно нумерации EU.

51. Связывающий агент по п. 50, отличающийся тем, что CH₃ в первой полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток глутаминовой кислоты в положении 357, остаток серина в положении 364, остаток аспарагиновой кислоты в положении 368, остаток серина в положении 370, остаток аспарагиновой кислоты в положении 384, остаток глутаминовой кислоты в положении 418 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 421 согласно нумерации EU, а CH₃ во второй полипептидной цепи включает аминокислотную последовательность, содержащую остаток глутамина в положении 357, остаток лизина в положении 364, остаток лейцина в положении 368, остаток лизина в положении 370, остаток аспарагина в положении 384, остаток глутамина в положении 418 и остаток аспарагина в положении 421 согласно нумерации EU.

52. Связывающий агент по любому из пп. 1-51, отличающийся тем, что первая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 28, или ее функциональный вариант.

53. Связывающий агент по любому из пп. 1-52, отличающийся тем, что вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 30, или ее функциональный вариант.

54. Связывающий агент по любому из пп. 1-53, отличающийся тем, что третья полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 31, или ее функциональный вариант.

55. Связывающий агент по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что третья полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 73, или ее функциональный вариант.

56. Связывающий агент по любому из пп. 1-55, отличающийся тем, что вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности,

выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74, 75, 76 и 77 или их функционального варианта.

57. Связывающий агент по любому из пп. 1-56, отличающийся тем, что третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

58. Связывающий агент по любому из пп. 1-12, 21-29, 32-35, 39, 41-45 и 47-57, отличающийся тем, что

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 75 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

59. Связывающий агент по любому из пп. 1-30, 33-40 и 42-57, отличающийся тем, что

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 74 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

60. Связывающий агент по любому из пп. 1-30, 33-40 и 42-57, отличающийся тем, что

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 76 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78 или ее функционального варианта.

61. Связывающий агент по любому из пп. 1-29, 31, 33-39 и 41-57, отличающийся тем, что

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73 или ее функционального варианта,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 77 или ее функционального варианта, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, или ее функционального варианта.

62. Связывающий агент по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2), VL(CLDN18.2), VH(CD3) и/или VL(CD3) являются гуманизированными.

63. Связывающий агент по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что CD3 экспрессируется на поверхности Т-клеток.

64. Связывающий агент по п. 63, отличающийся тем, что связывание связывающего агента с CD3 на Т-клетках приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток.

65. Связывающий агент по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что CLDN18.2 экспрессируется в раковых клетках.

66. Связывающий агент по п. 65, отличающийся тем, что CLDN18.2 экспрессируется на поверхности раковых клеток.

67. Связывающий агент по п. 65 или 66, отличающийся тем, что связывающий агент связывается с внеклеточной частью CLDN18.2.

68. Связывающий агент по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что связывающий агент индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

69. Связывающий агент по любому из пп. 65-68, отличающийся тем, что раковые клетки происходят из рака, выбранного из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

70. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептидную цепь связывающего агента по любому из пп. 1-69.

71. Нуклеиновая кислота, кодирующая связывающий агент по любому из пп. 1-69.

72. Набор нуклеиновых кислот, вместе кодирующих связывающий агент по любому из пп. 1-69.

73. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 70.

74. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 71 или набор нуклеиновых кислот по п. 72.

75. Набор векторов, содержащий набор нуклеиновых кислот по п. 72.

76. Вектор по п. 74 или набор векторов по п. 75, который способен экспрессировать связывающий агент.

77. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 71, набор нуклеиновых кислот по п. 72, вектор по п. 74 или 76 или набор векторов по п. 75 или 76.

78. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающий агент по любому из пп. 1-69, нуклеиновую кислоту по п. 71, набор нуклеиновых кислот по п. 72, вектор по п. 74 или 76, набор векторов по п. 75 или 76, или клетка-хозяин по п. 77.

79. Связывающий агент по любому из пп. 1-69, нуклеиновая кислота по п. 71, набор нуклеиновых кислот по п. 72, вектор по п. 74 или 76, набор векторов по п. 75 или 76, клетка-хозяин по п. 77 или фармацевтическая композиция по п. 78 для применения в терапии.

80. Связывающий агент по любому из пп. 1-69, нуклеиновая кислота по п. 71, набор нуклеиновых кислот по п. 72, вектор по п. 74 или 76, набор векторов по п. 75 или 76, клетка-хозяин по п. 77 или фармацевтическая композиция по п. 78 для применения при лечении или профилактике рака, связанного с раковыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2.

81. Связывающий агент, нуклеиновая кислота, набор нуклеиновых кислот, вектор, набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения по п. 80, где рак выбрана из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рак яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

82. Применение связывающего агента по любому из пп. 1-69, нуклеиновой кислоты по п. 71, набора нуклеиновых кислот по п. 72, вектора по п. 74 или 76, набора векторов по п. 75 или 76, клетки-хозяина по п. 77 или фармацевтической композиции по п. 78 для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики онкологического заболевания, включающего раковые клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

83. Применение по п. 82, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и его

метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

84. Способ лечения или профилактики рака, включающего раковые клетки, экспрессирующие CLDN18.2, отличающийся тем, что способ включает введение связывающего агента по любому из пп. 1-69, нуклеиновой кислоты по п. 71, набора нуклеиновых кислот по п. 72, вектора по п. 74 или 76, набора векторов по п. 75 или 76, клетки-хозяина по п. 77 или фармацевтической композиции по п. 78 субъекту, имеющему рак.

85. Способ по п. 84, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичников, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

86. Связывающий агент, включающий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2, содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH), полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VH(CLDN18.2)) и вариабельную область легкой цепи (VL), полученную из иммуноглобулина со специфичностью к CLDN18.2 (VL(CLDN18.2)), где

VH(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 32), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность NIYPSDSYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 33), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SWRGNSFDY (SEQ ID NO: 34) и

VL(CLDN18.2) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 35), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность WASTRES (SEQ ID NO: 36), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QNDYSYPFT (SEQ ID NO: 37).

87. Связывающий агент по п. 86, дополнительно включающий связывающий домен, специфичный к CD3.

88. Связывающий агент по п. 87, отличающийся тем, что связывающий домен со специфичностью к CD3 содержит VH, полученный из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VH(CD3)) и VL, полученный из иммуноглобулина со специфичностью к CD3 (VL(CD3)), где

VH(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 и 61, и

VL(CD3) включает CDR1, CDR2 и CDR3 из SEQ ID NO: 55.

89. Связывающий агент по п. 88, отличающийся тем, что

VH(CD3) включает

(i) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKANNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 50) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант,

(ii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDEYVSWFAY (SEQ ID NO: 51) или ее функциональный вариант, или

(iii) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 43) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 44) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 45) или ее функциональный вариант, и

VL(CD3) включает CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 46) или ее функциональный вариант, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 47) или ее функциональный вариант, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 48) или ее функциональный вариант.

90. Связывающий агент по любому из пп. 86-89, отличающийся тем, что

VH(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 39, или ее функционального варианта, и/или

VL(CLDN18.2) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 42, или ее функционального варианта.

91. Связывающий агент по любому из пп. 88-90, отличающийся тем, что

VH(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, 58 или 61 или ее функционального варианта, и

VL(CD3) включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 55, или ее функционального варианта.

92. Связывающий агент по любому из пп. 86-91, отличающийся тем, что связывающий агент имеет формат полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

93. Связывающий агент по любому из пп. 86-92, отличающийся тем, что связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 имеет формат фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или фрагмента scFv.

94. Связывающий агент по любому из пп. 87-93, отличающийся тем, что связывающий домен со специфичностью к CD3 имеет формат фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv или фрагмента scFv.

95. Связывающий агент по любому из пп. 87-94, отличающийся тем, что связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 имеет формат фрагмента Fab, а связывающий домен со специфичностью к CD3 имеет формат фрагмента scFv.

96. Связывающий агент по любому из пп. 86-95, отличающийся тем, что связывающий агент представляет собой биспецифическую молекулу.

97. Связывающий агент по п. 96, отличающийся тем, что биспецифическая молекула представляет собой биспецифическое антитело.

98. Связывающий агент по любому из пп. 86-97, отличающийся тем, что связывающий агент способен моновалентно или бивалентно связываться с CLDN18.2.

99. Связывающий агент по любому из пп. 86-98, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2), VL(CLDN18.2), VH(CD3) и/или VL(CD3) являются гуманизированными.

100. Связывающий агент по любому из пп. 86-99, отличающийся тем, что VH(CLDN18.2) соединен с VL(CLDN18.2) посредством пептидного линкера и/или VH(CD3) соединен с VL(CD3) с помощью пептидного линкера.

101. Связывающий агент по п. 100, отличающийся тем, что пептидный линкер включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-20.

102. Связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3,

отличающийся тем, что связывающий агент содержит четыре полипептидные цепи, где

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 74,

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, и

(iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи,

где первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

103. Связывающий агент, содержащий связывающий домен со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3,

отличающийся тем, что связывающий агент содержит три полипептидные цепи, где

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 75, и

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78,

при этом первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью.

104. Связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3,

отличающийся тем, что связывающий агент содержит четыре полипептидные цепи, где

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 76,

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, и

(iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи,

где первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

105. Связывающий агент, содержащий два связывающих домена со специфичностью к CLDN18.2 и связывающий домен со специфичностью к CD3,

отличающийся тем, что связывающий агент содержит четыре полипептидные цепи, где

(i) первая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 73,

(ii) вторая полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 77,

(iii) третья полипептидная цепь включает или состоит из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 78, и

(iv) четвертая полипептидная цепь идентична третьей полипептидной цепи,

где первая полипептидная цепь взаимодействует со второй полипептидной цепью и с третьей полипептидной цепью, а вторая полипептидная цепь взаимодействует с четвертой полипептидной цепью.

106. Связывающий агент по любому из пп. 87-105, отличающийся тем, что CD3 экспрессируется на поверхности Т-клеток.

107. Связывающий агент по п. 106, отличающийся тем, что связывание связывающего агента с CD3 на Т-клетках приводит к пролиферации и/или активации Т-клеток.

108. Связывающий агент по любому из пп. 86-107, отличающийся тем, что CLDN18.2 экспрессируется в раковых клетках.

109. Связывающий агент по п. 108, отличающийся тем, что CLDN18.2 экспрессируется на поверхности раковых клеток.

110. Связывающий агент по п. 108 или 109, отличающийся тем, что связывающий агент связывается с внеклеточной частью CLDN18.2.

111. Связывающий агент по любому из пп. 86-110, отличающийся тем, что связывающий агент индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении раковых клеток, экспрессирующих CLDN18.2.

112. Связывающий агент по любому из пп. 108-111, отличающийся тем, что раковые клетки происходят из рака, выбранного из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

113. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептидную цепь связывающего агента по любому из пп. 102-112.

114. Нуклеиновая кислота, кодирующая связывающий агент по любому из пп. 86-112.

115. Набор нуклеиновых кислот, вместе кодирующих связывающий агент по любому из пп. 86-112.

116. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. 113.

117. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по п. 114 или набор нуклеиновых кислот по п. 115.

118. Набор векторов, включающий набор нуклеиновых кислот по п. 115.

119. Вектор по п. 117 или набор векторов по п. 118, который способен экспрессировать связывающий агент.

120. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 114, набор нуклеиновых кислот по п. 115, вектор по п. 117 или 119 или набор векторов по п. 118 или 119.

121. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающий агент по любому из пп. 86-112, нуклеиновую кислоту по п. 114, набор нуклеиновых кислот по п. 115, вектор по п. 117 или 119, набор векторов по п. 118 или 119, или клетка-хозяин по п. 120.

122. Связывающий агент по любому из пп. 86-112, нуклеиновая кислота по п. 114, набор нуклеиновых кислот по п. 115, вектор по п. 117 или 119, набор векторов по п. 118 или 119, клетка-хозяин по п. 117 или 119, клетка-хозяин по п. 120 или фармацевтическая композиция по п. 121 для применения в терапии.

123. Связывающий агент по любому из пп. 86–112, нуклеиновая кислота по п. 114, набор нуклеиновых кислот по п. 115, вектор по п. 117 или 119, набор векторов по п. 118 или 119, клетка-хозяин по п. 120 или фармацевтическая композиция по п. 121 для применения при лечении или профилактике рака, связанного с раковыми клетками, экспрессирующими CLDN18.2.

124. Связывающий агент, нуклеиновая кислота, набор нуклеиновых кислот, вектор, набор векторов, клетка-хозяин или фармацевтическая композиция для применения по п. 123, где рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рак яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы и шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

125. Применение связывающего агента по любому из пп. 86-112, нуклеиновой кислоты по п. 114, набора нуклеиновых кислот по п. 115, вектора по п. 117 или 119,

набора векторов по п. 118 или 119, клетки-хозяина по п. 120 или фармацевтической композиции по п. 121 для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики рака, включающего раковые клетки, экспрессирующие CLDN18.2.

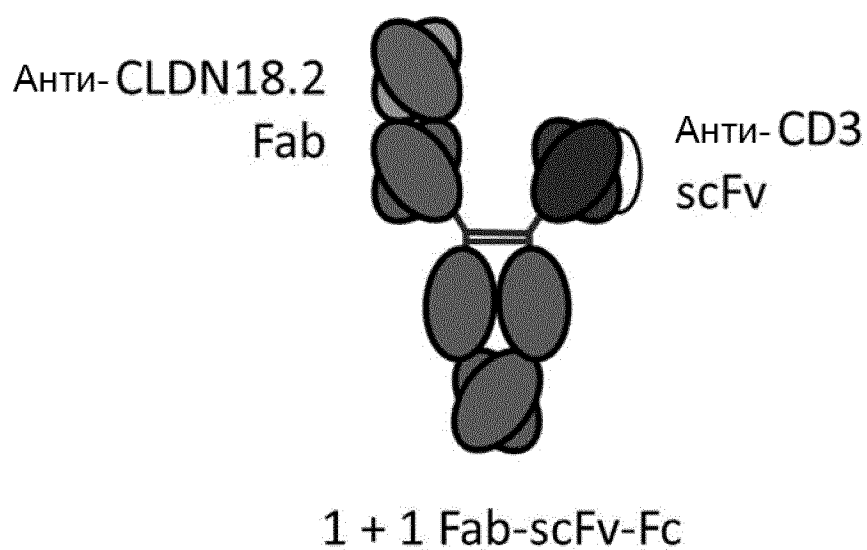
126. Применение по п. 125, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичника, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

127. Способ лечения или профилактики рака, включающего раковые клетки, экспрессирующие CLDN18.2, отличающийся тем, что способ включает введение связывающего агента по любому из пп. 86-112, нуклеиновой кислоты по п. 114, набора нуклеиновых кислот по п. 115, вектора по п. 117 или 119, набора векторов по п. 118 или 119, клетки-хозяина по п. 120 или фармацевтической композиции по п. 121 субъекту, имеющему злокачественную опухоль.

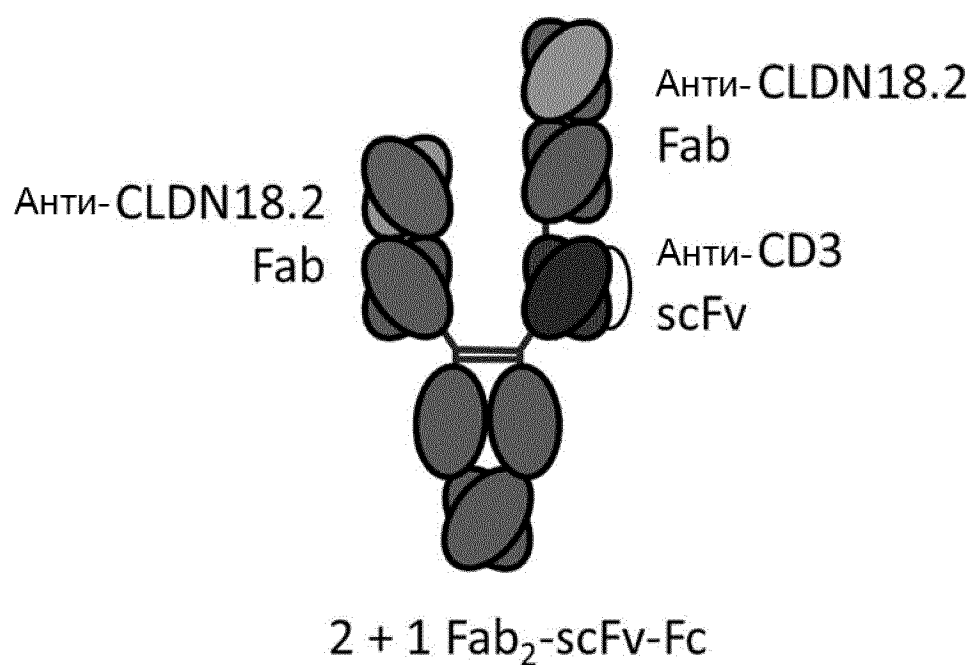
128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из рака желудка, рака пищевода, рака гастроэзофагеального перехода (ГЭП), рака поджелудочной железы, рака легкого, такого как немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака молочной железы, рака яичников, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака печени, рака головы-шеи, рака желчного пузыря и его метастаза, опухоли Крукенберга, метастаза в брюшину и/или метастаза в лимфатические узлы.

129. Способ получения связывающего агента по любому из пп. 1-69 и 86-112.

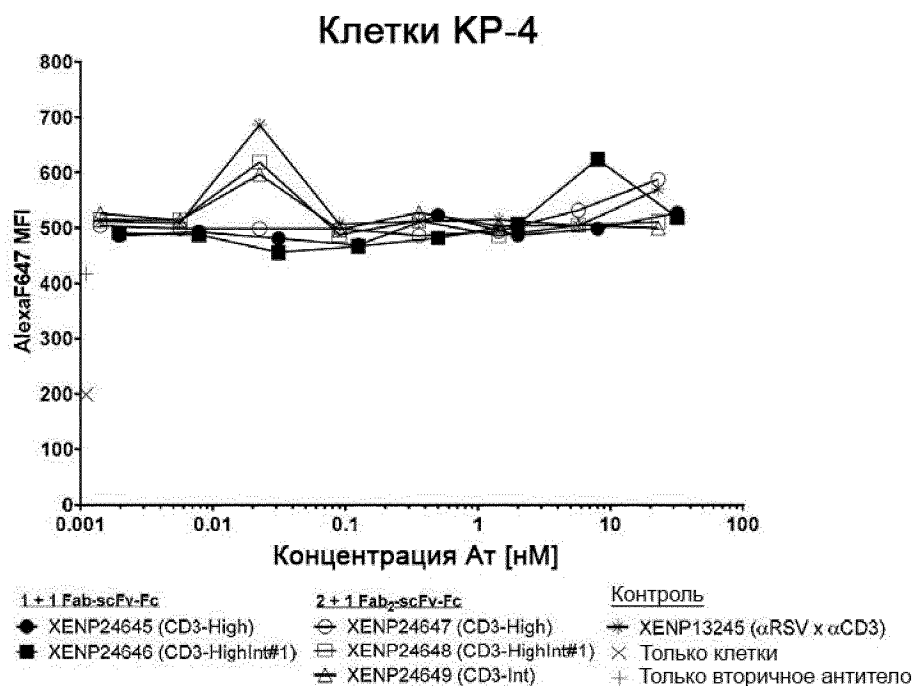
130. Способ по п. 129, включающий трансфекцию клетки-хозяина нуклеиновой кислотой по п. 71 или 114, набором нуклеиновых кислот по п. 72 или 115, вектором по любому из пп. 74, 76, 117 или 119 или набором векторов по любому из пп. 75, 76, 118 или 119.



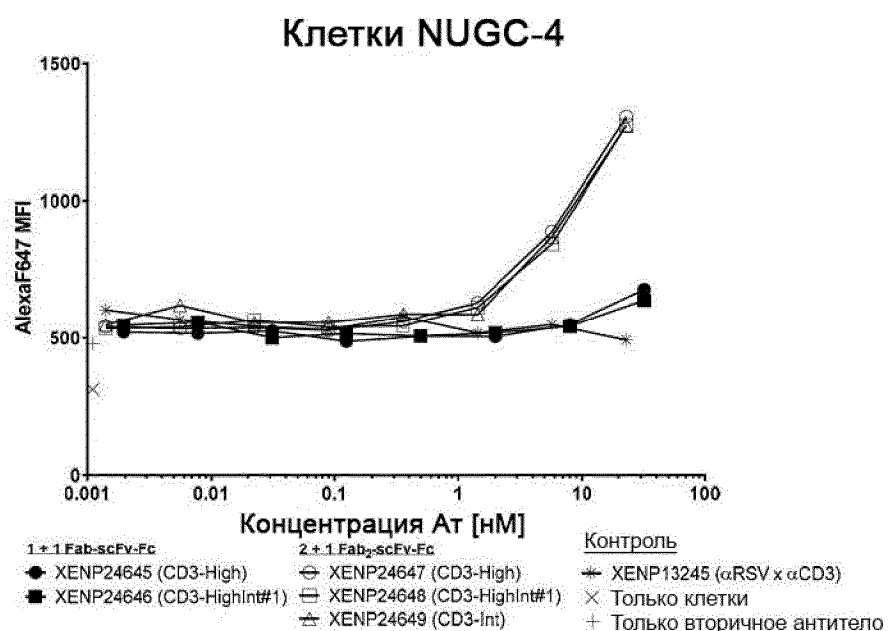
Фиг. 1А



Фиг. 1В

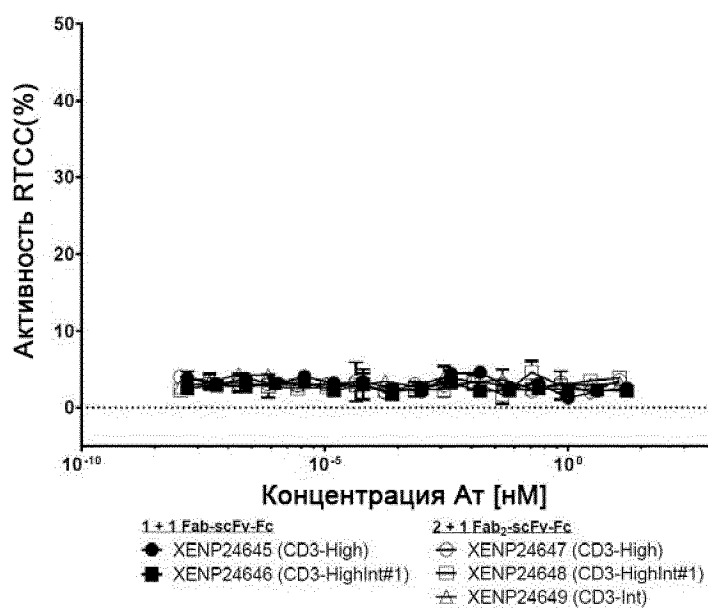


Фиг. 2А



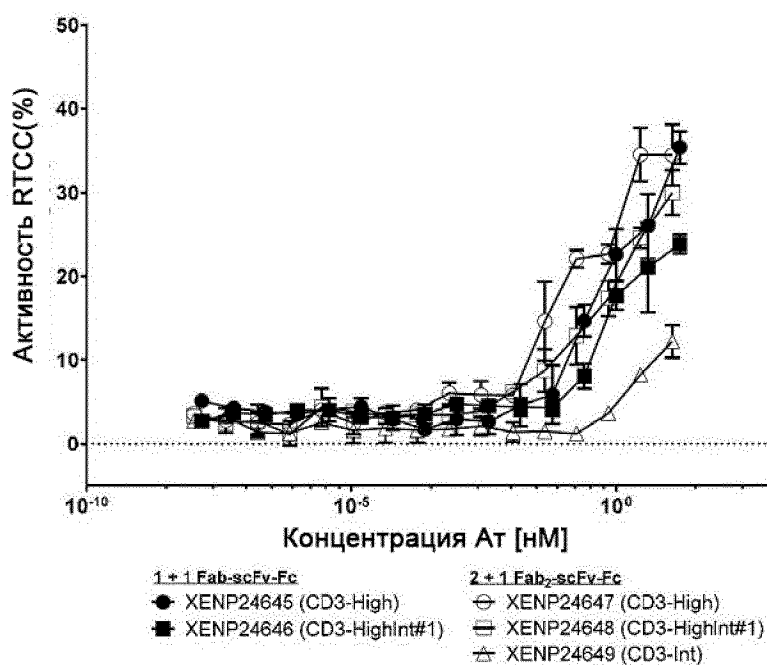
Фиг. 2В

KP-4

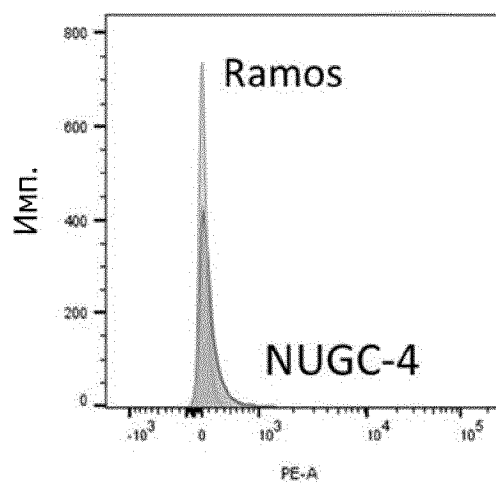


Фиг. 3А

NUGC-4

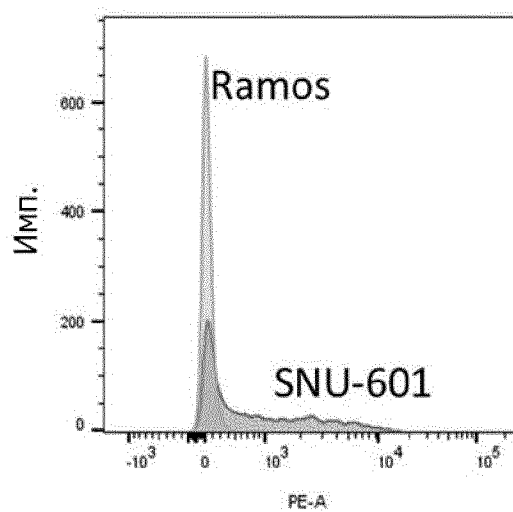


Фиг. 3В



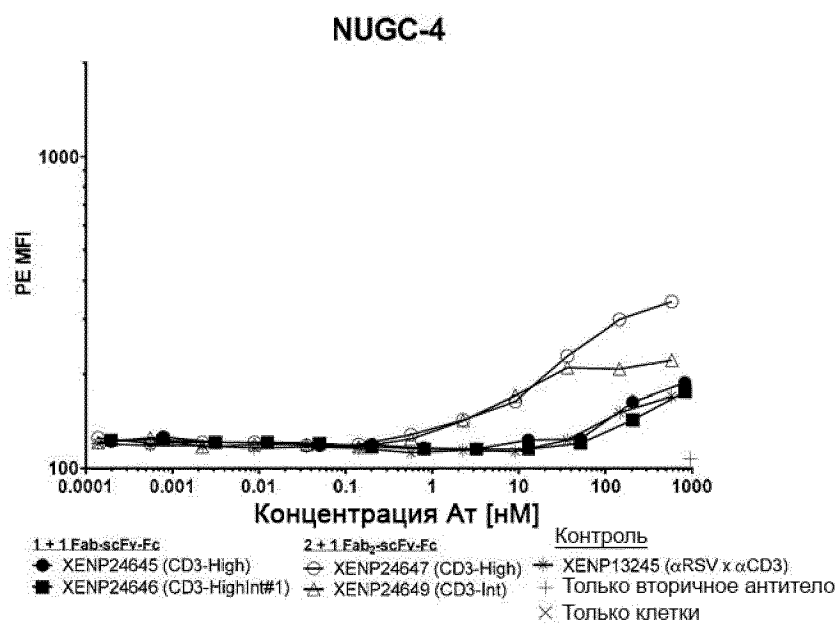
Образец	Субпопуляция	Имп.	Концентрация (мкг/мл)	Тестируемое изделие	Среднее: PE-A
Ramos	Живые клетки	4671	2.38	XENP24647	125
NUGC-4	Живые клетки	4627	100.00	XENP24647	342

Фиг. 4А

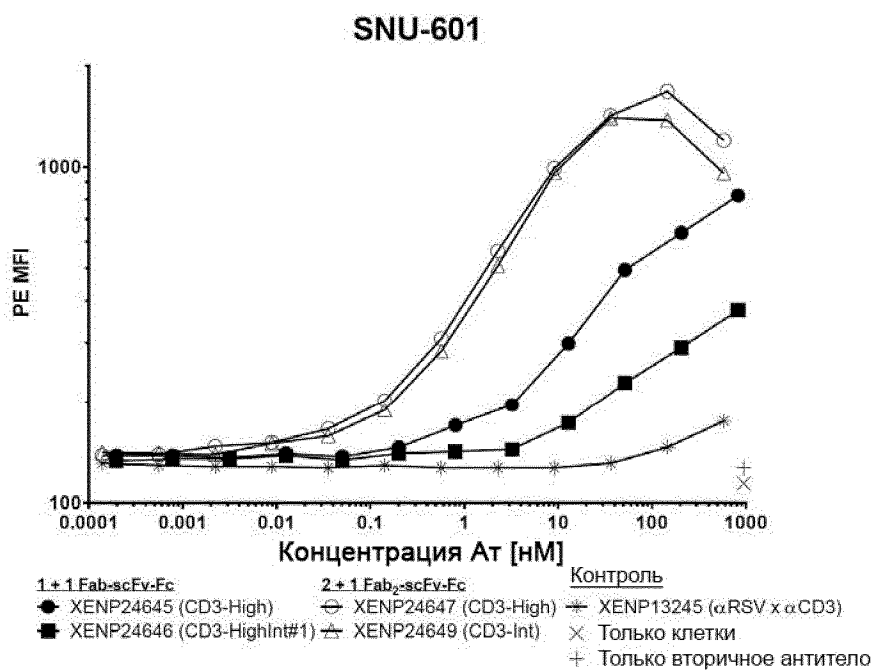


Образец	Субпопуляция	Имп.	Концентрация (мкг/мл)	Тестируемое изделие	Среднее: PE-A
Ramos	Живые клетки	4622	2.38	XENP24647	138
SNU-601	Живые клетки	4600	25.00	XENP24647	1673

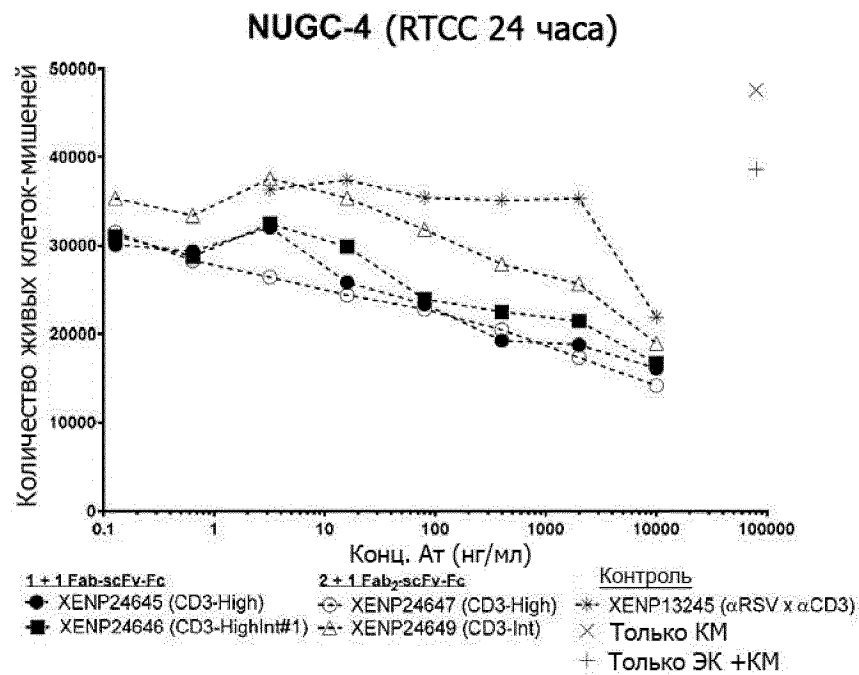
Фиг. 4В



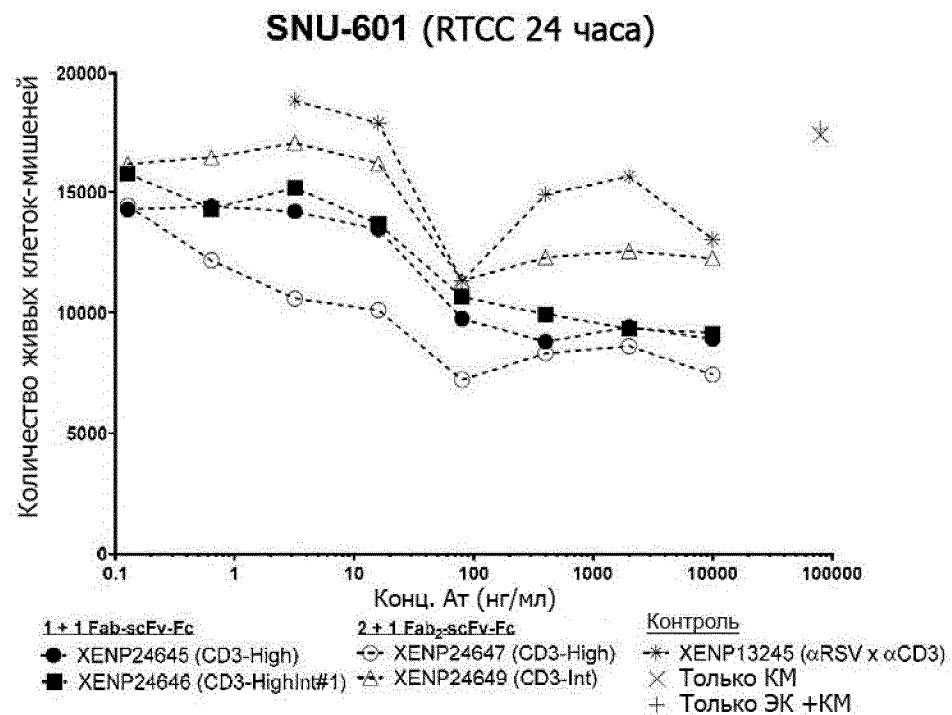
Фиг. 5А



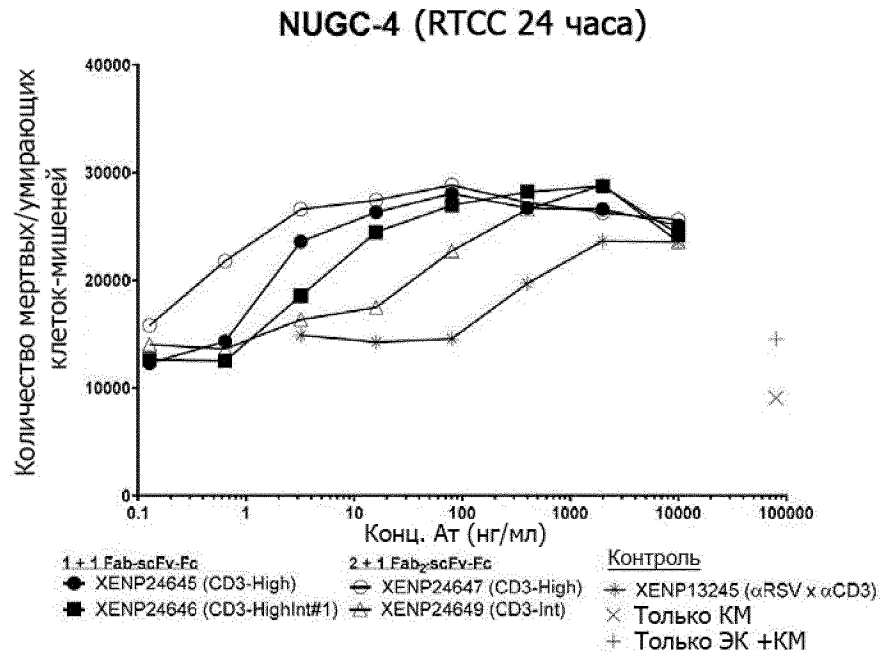
Фиг. 5В



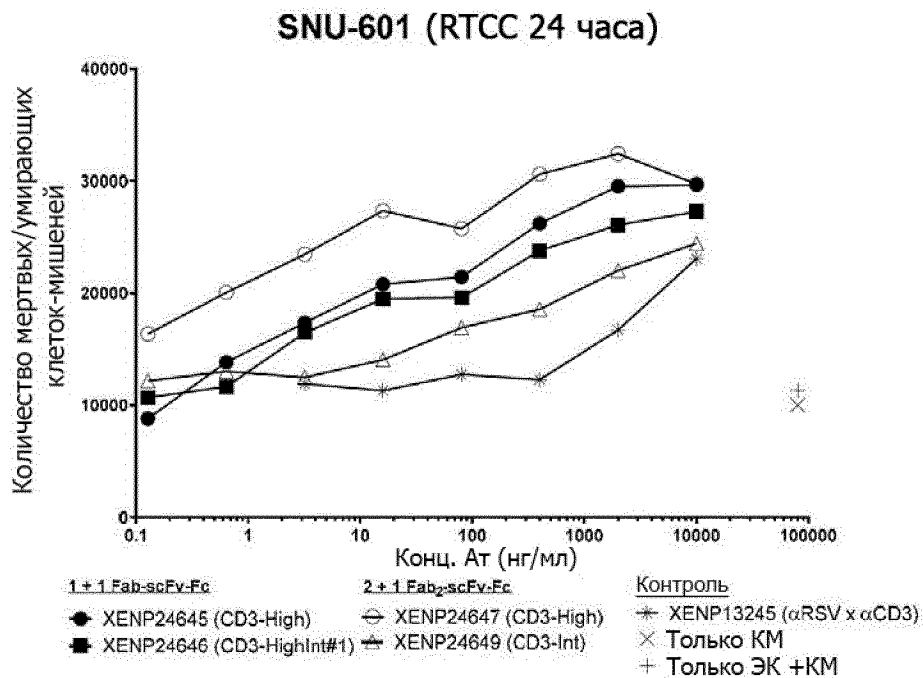
Фиг. 6А



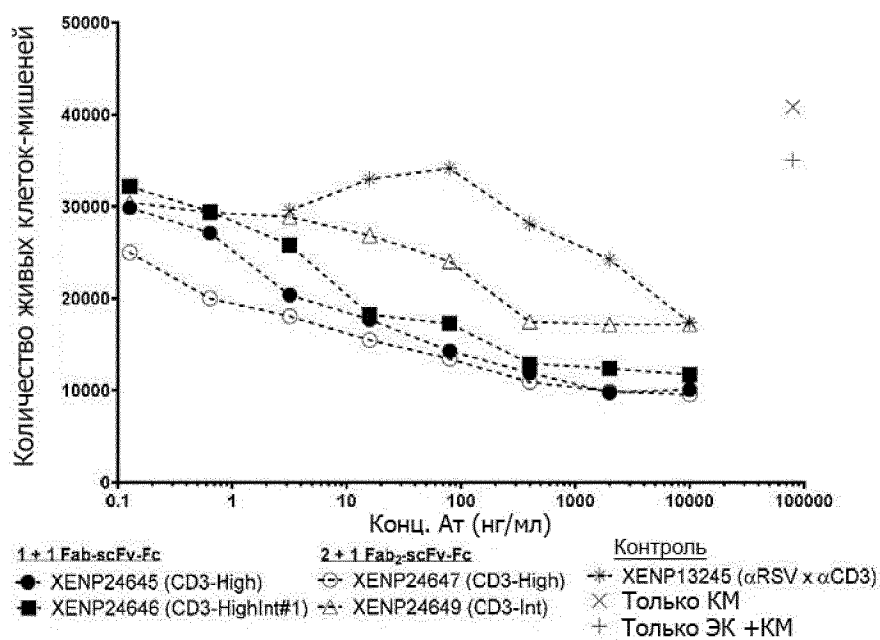
Фиг. 6В



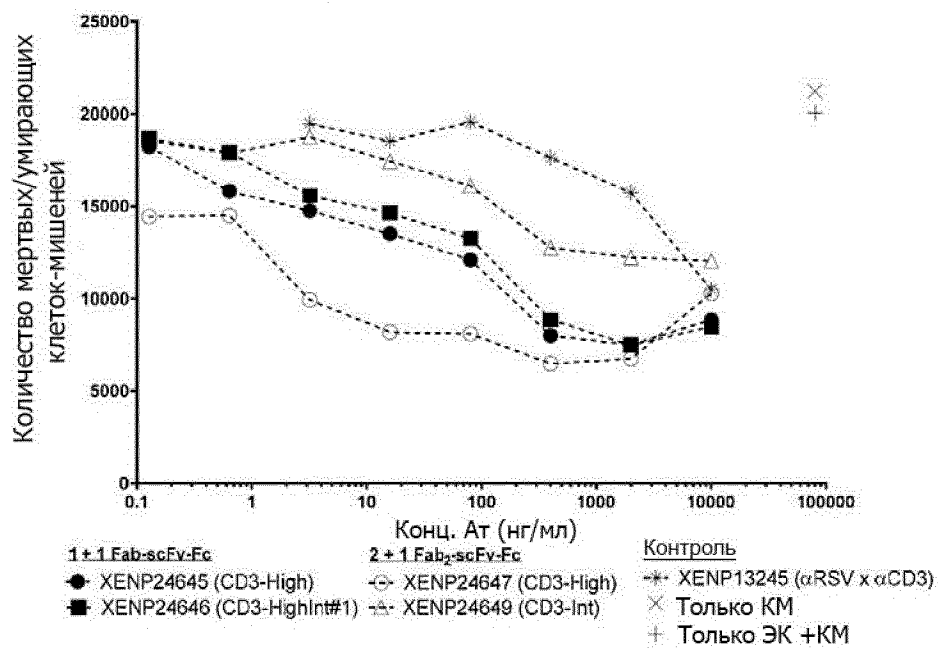
Фиг. 7А



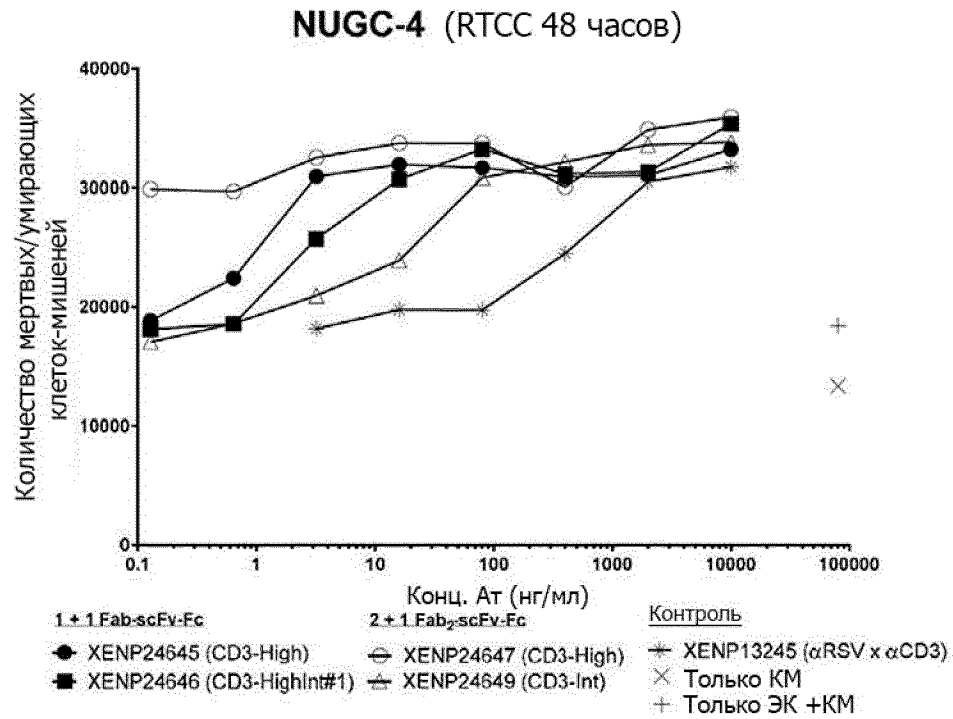
Фиг. 7В

NUGC-4 (RTCC 48 часов)

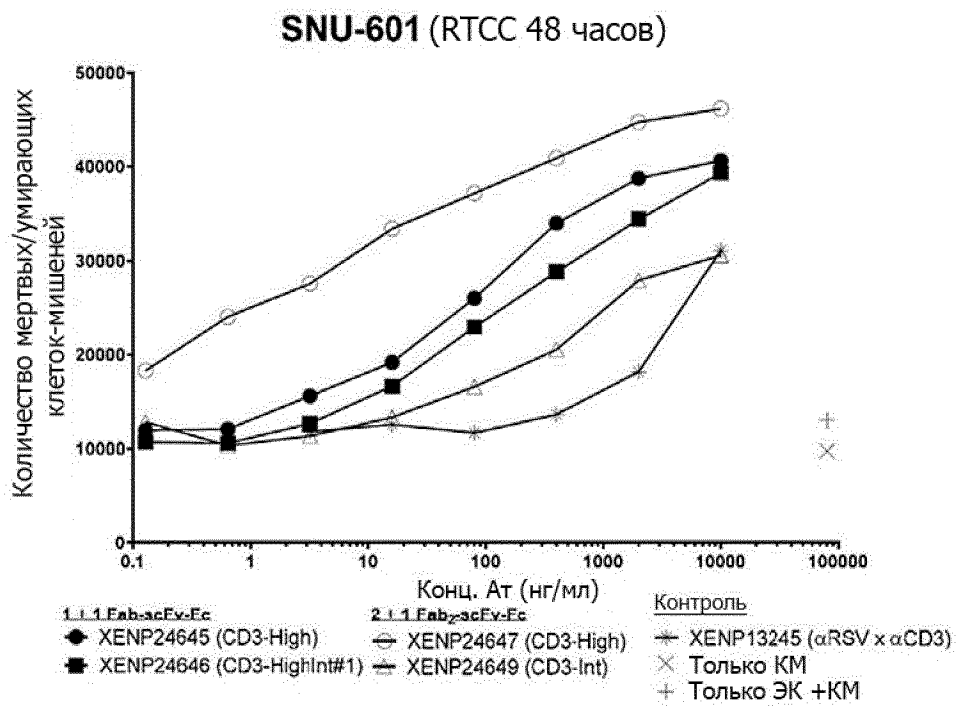
Фиг. 8А

SNU-601 (RTCC 48 часов)

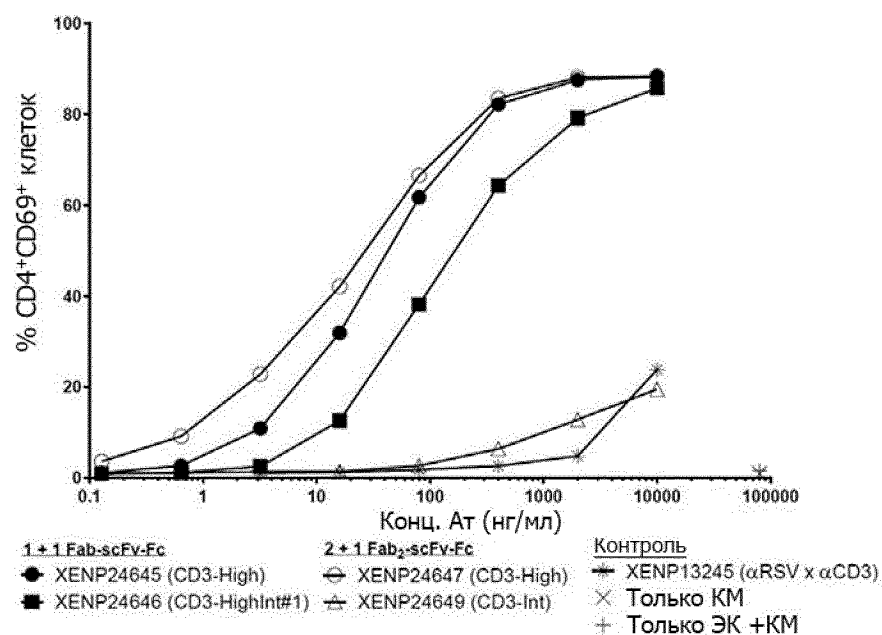
Фиг. 8В



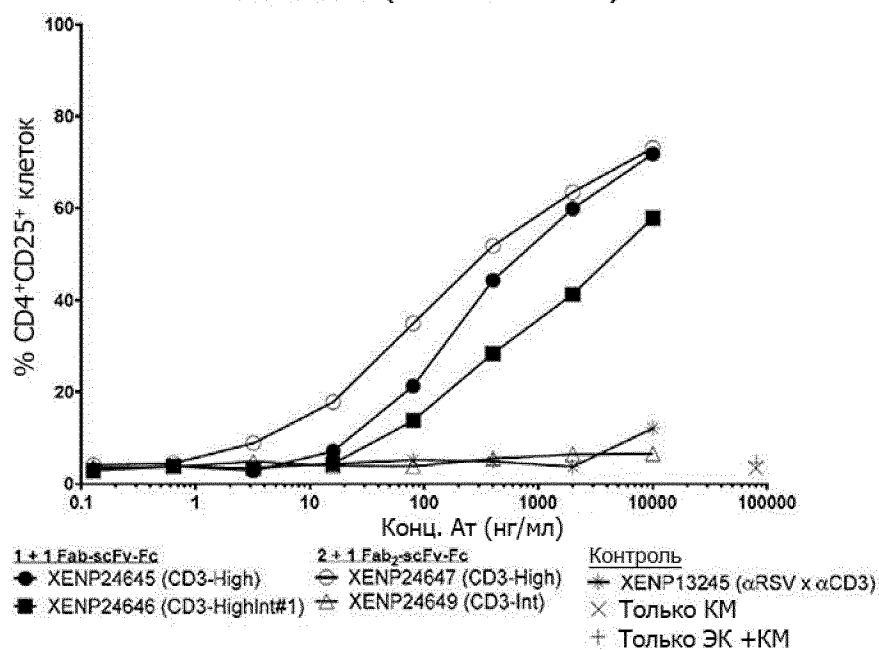
Фиг. 9А



Фиг. 9В

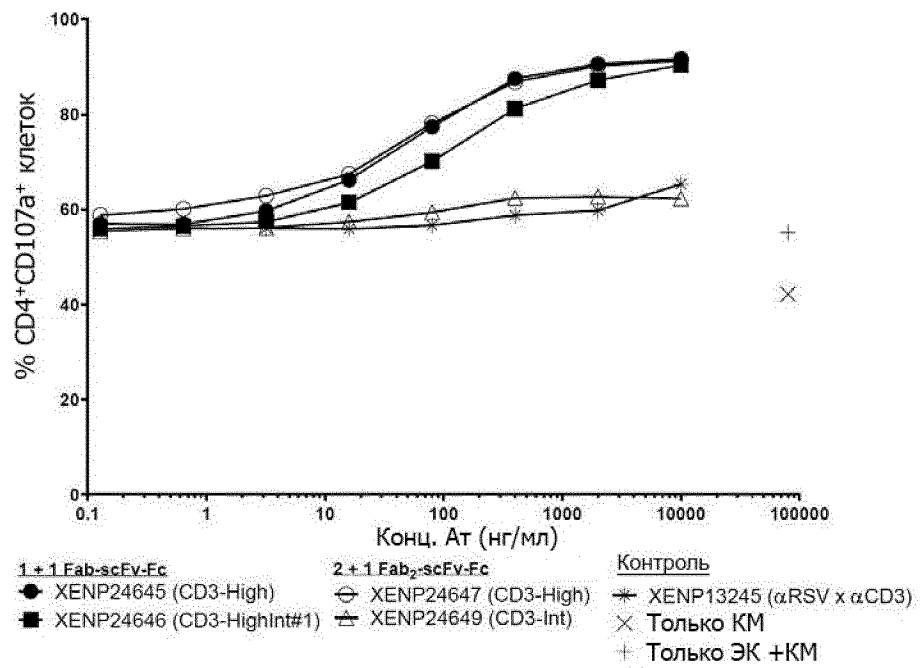
NUGC-4 (RTCC 48 часов)

Фиг. 10А

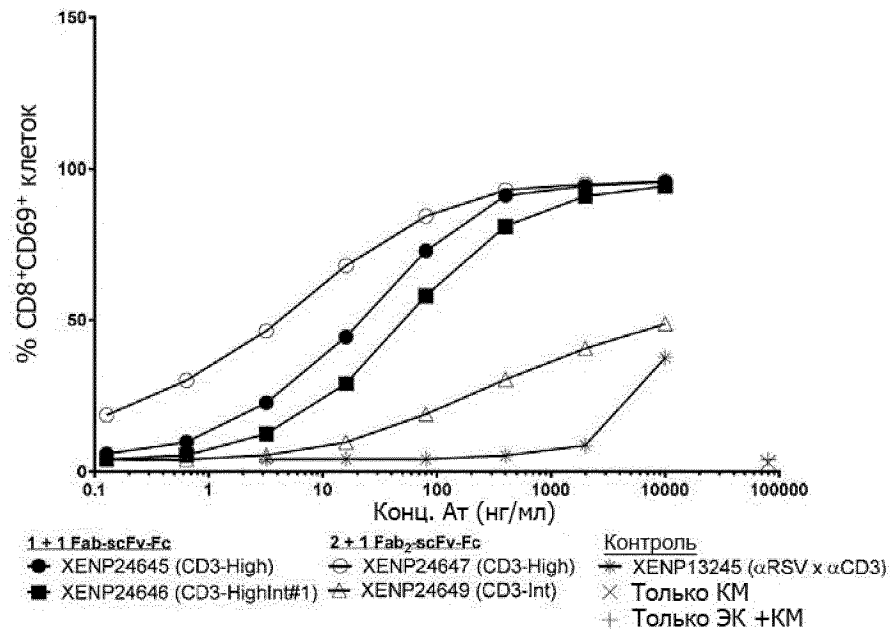
NUGC-4 (RTCC 48 часов)

Фиг. 10В

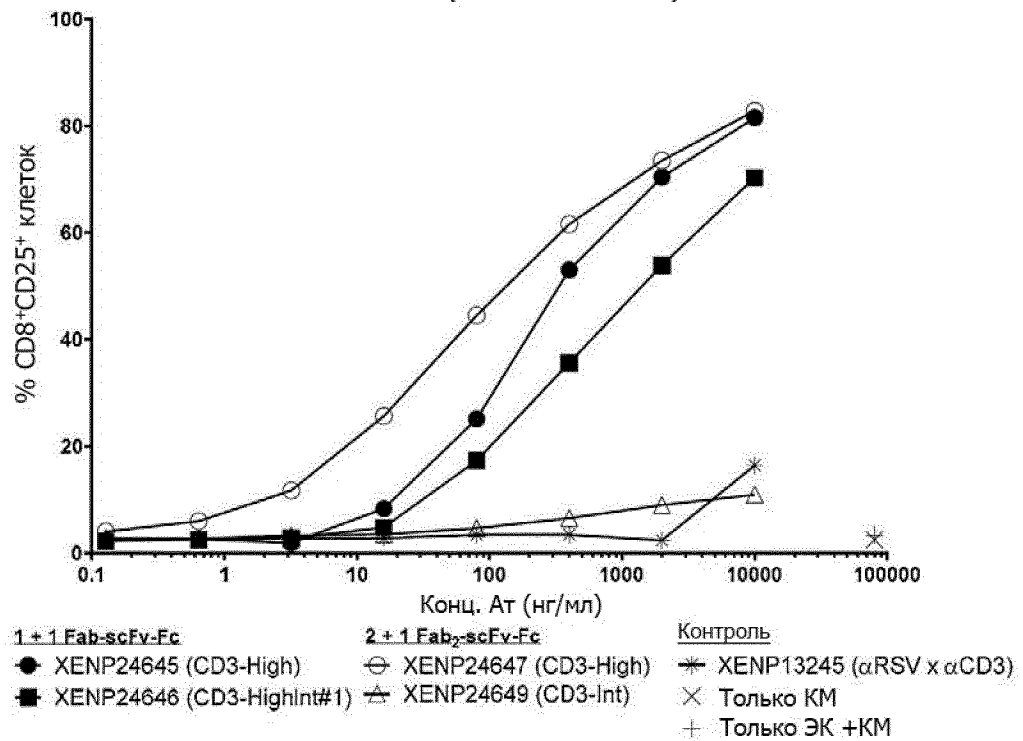
NUGC-4 (RTCC 48 часов)



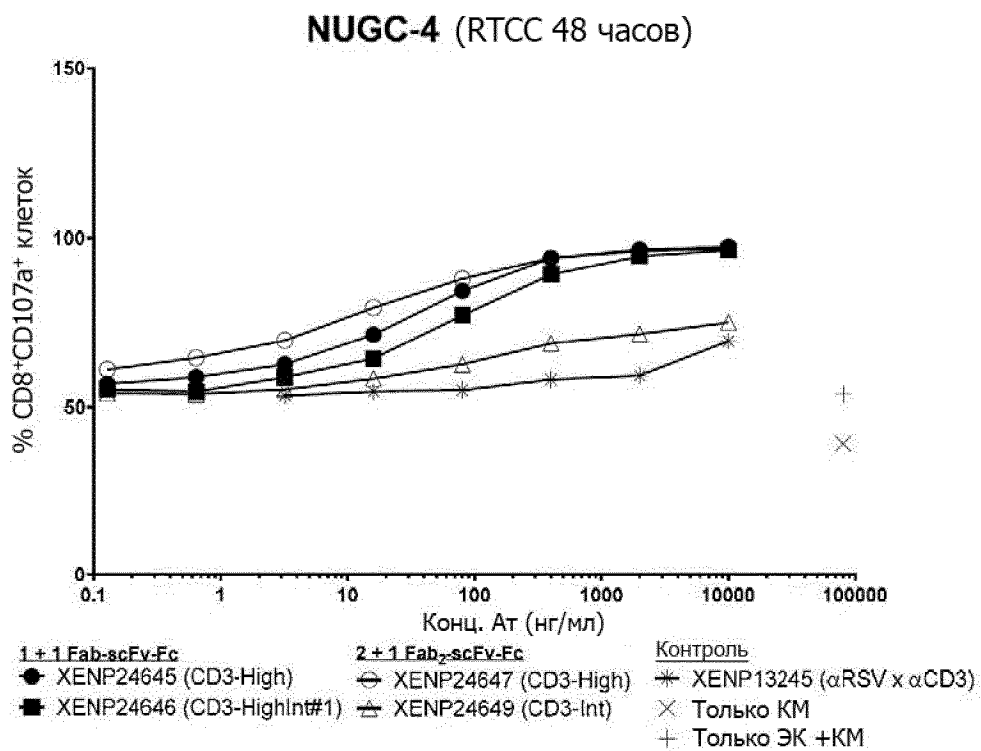
Фиг. 10С

NUGC-4 (RTCC 48 часов)

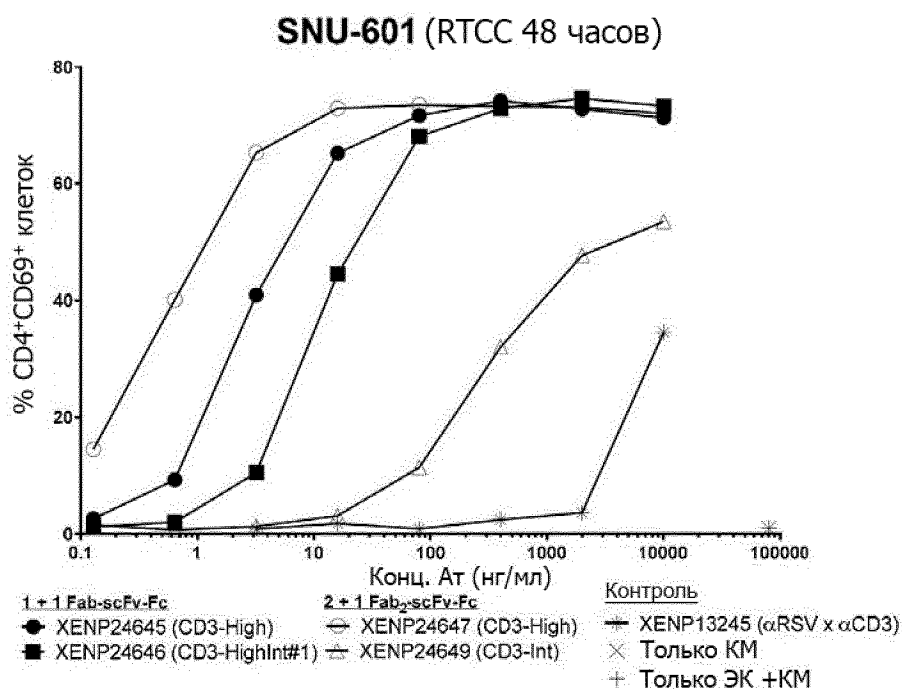
Фиг. 11А

NUGC-4 (RTCC 48 часов)

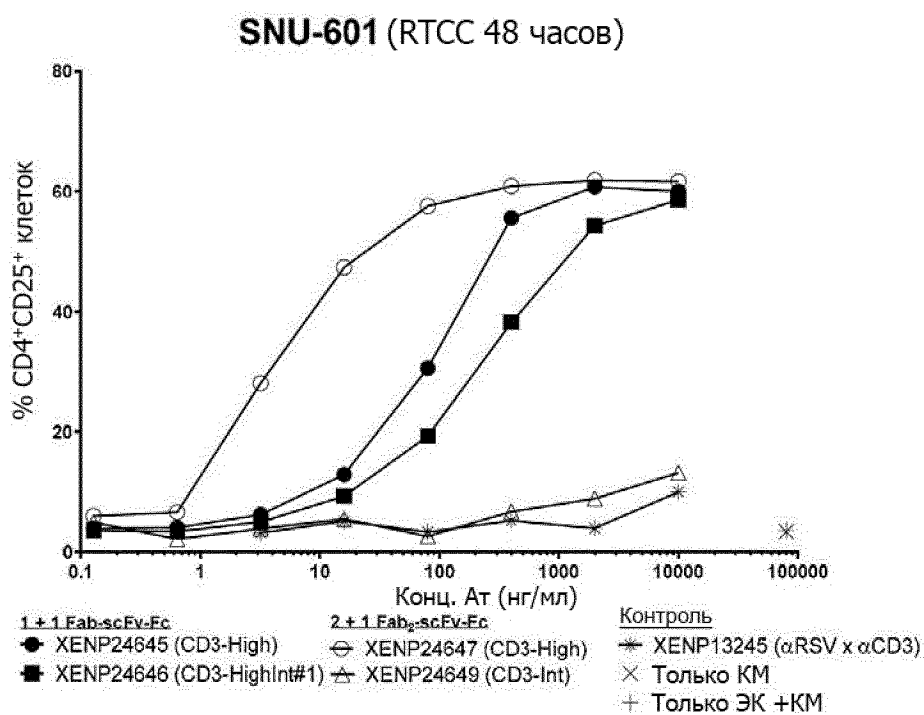
Фиг. 11В



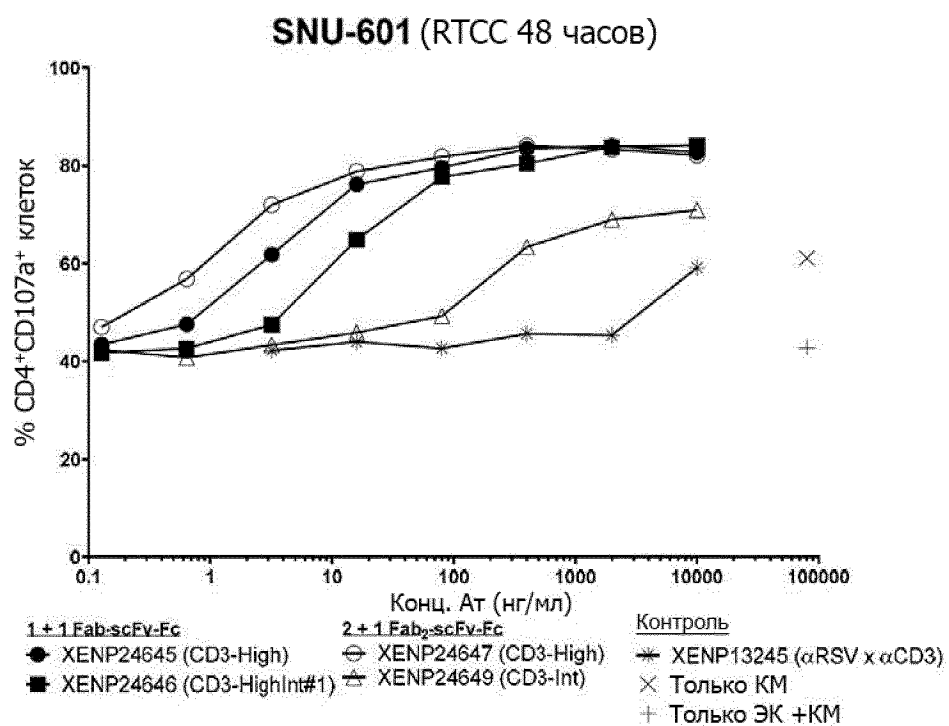
Фиг. 11С



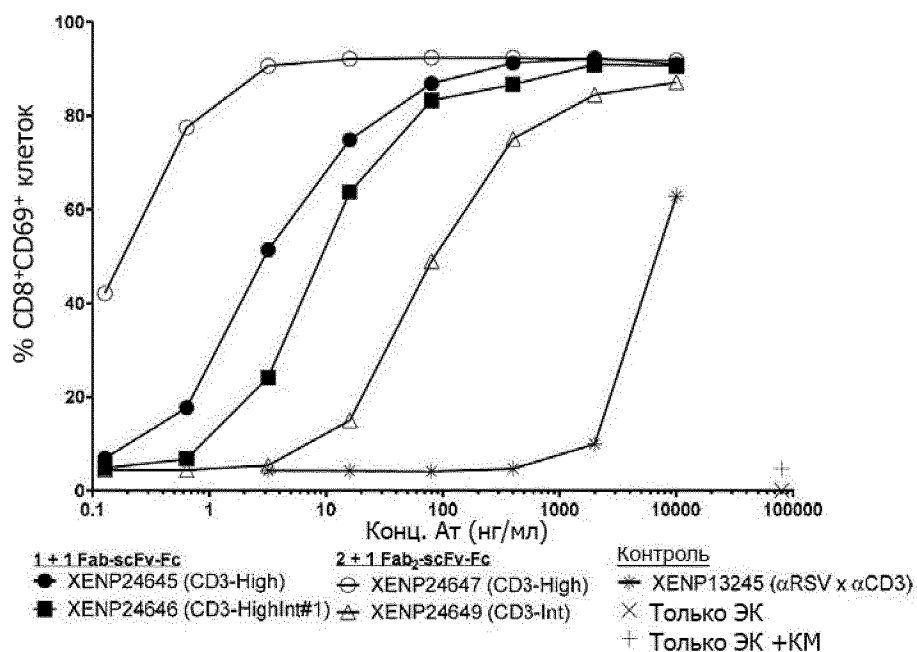
Фиг. 12А



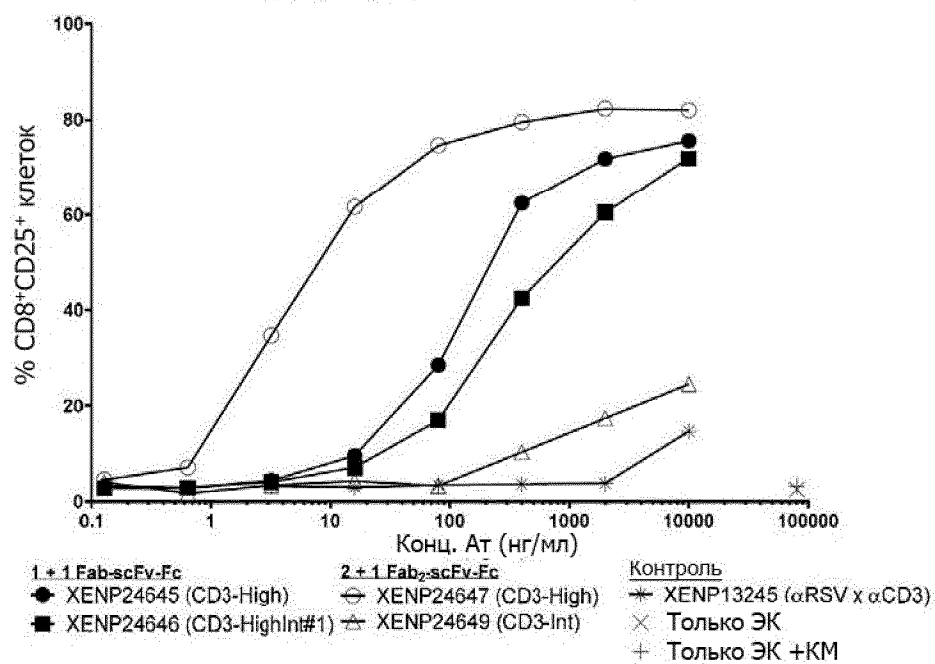
Фиг. 12В



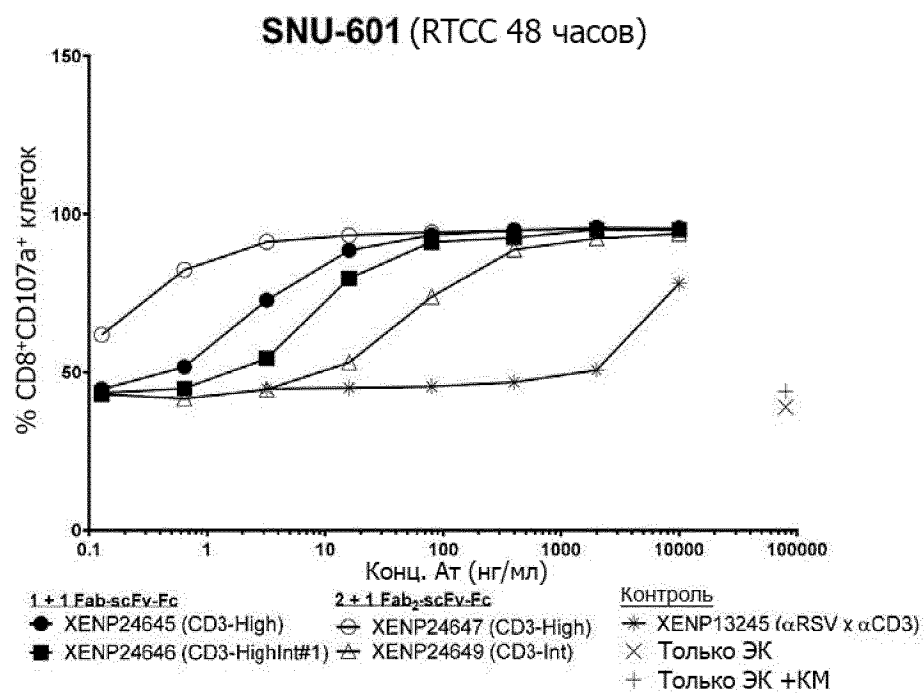
Фиг. 12С

SNU-601 (RTCC 48 часов)

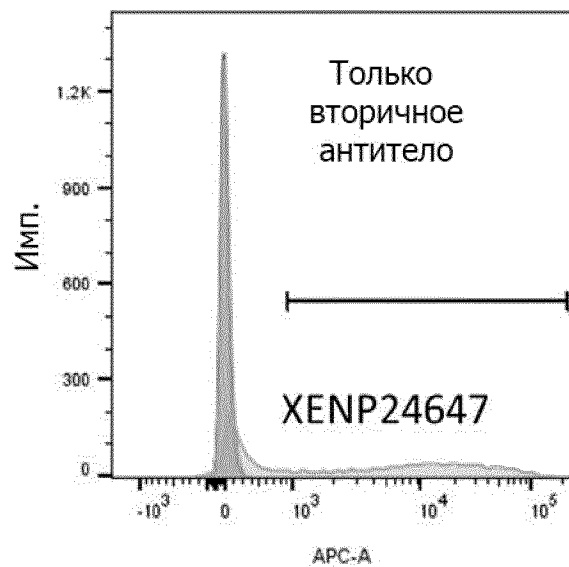
Фиг. 13А

SNU-601 (RTCC 48 часов)

Фиг. 13В

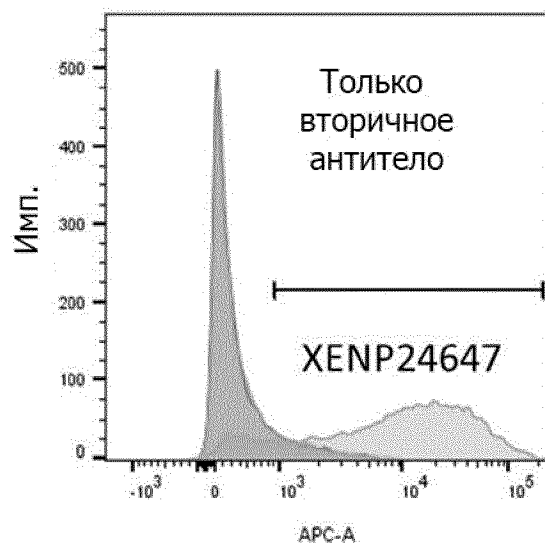


Фиг. 13С



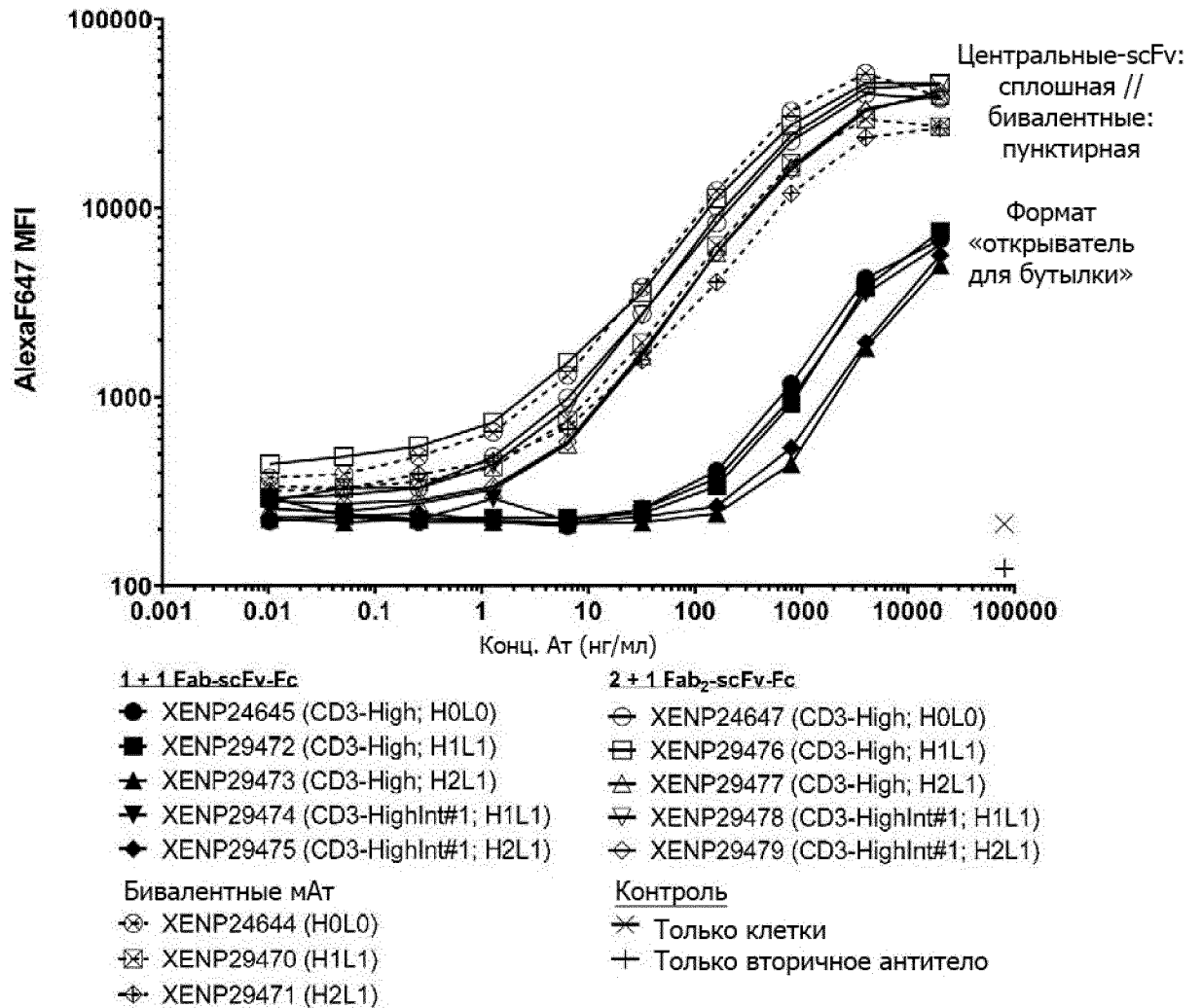
Образец	Подмножество	Имп.	Тестируемое изделие	Среднее: APC-A
SNU-601	Живые клетки	7883	Только вторичное антитело	129
SNU-601	Живые клетки	7926	XENP24647	14829

Фиг. 14А

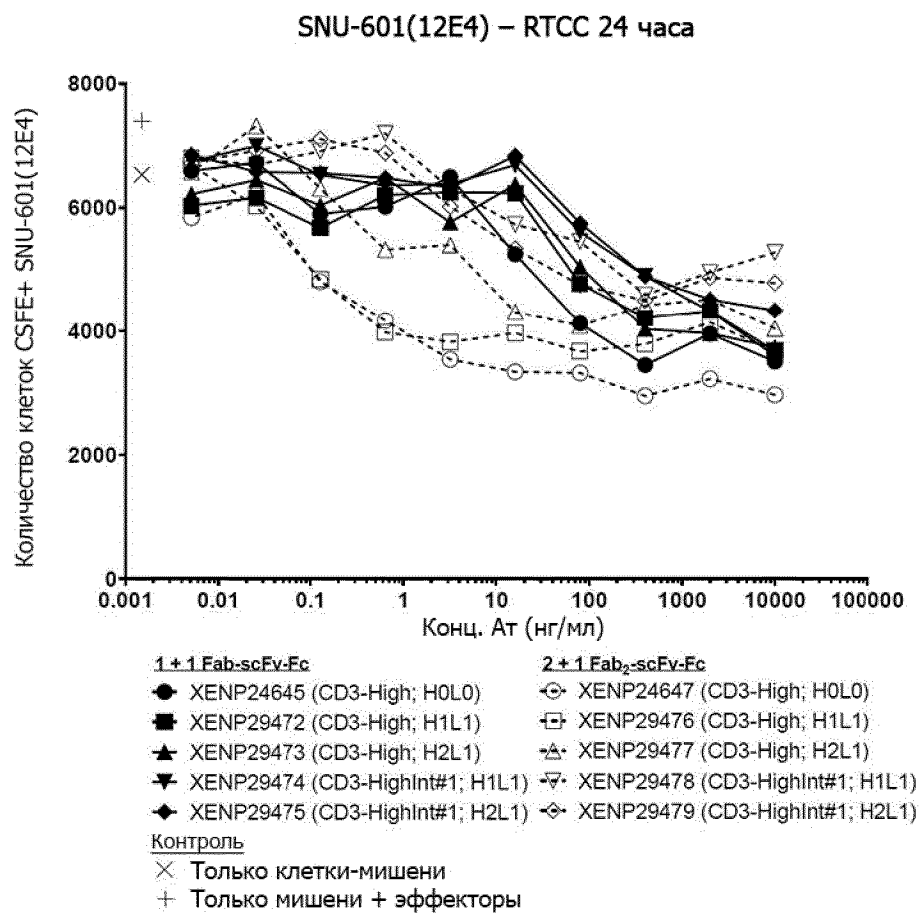


Образец	Подмножество	Имп.	Тестируемое изделие	Среднее: APC-A
SNU-601(2E4)	Живые клетки	7708	Только вторичное антитело	589
SNU-601(2E4)	Живые клетки	7850	XENP24647	20878

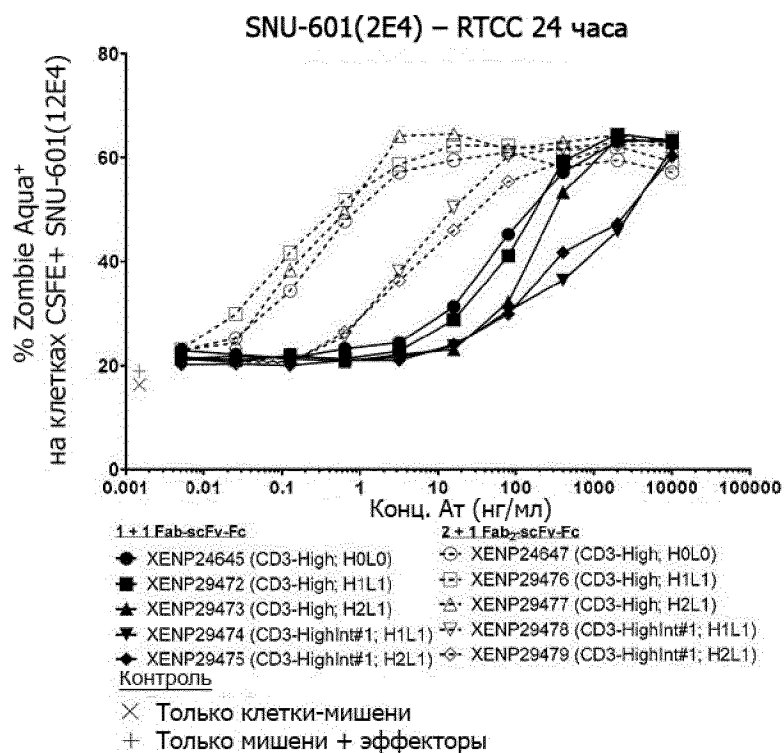
Фиг. 14В



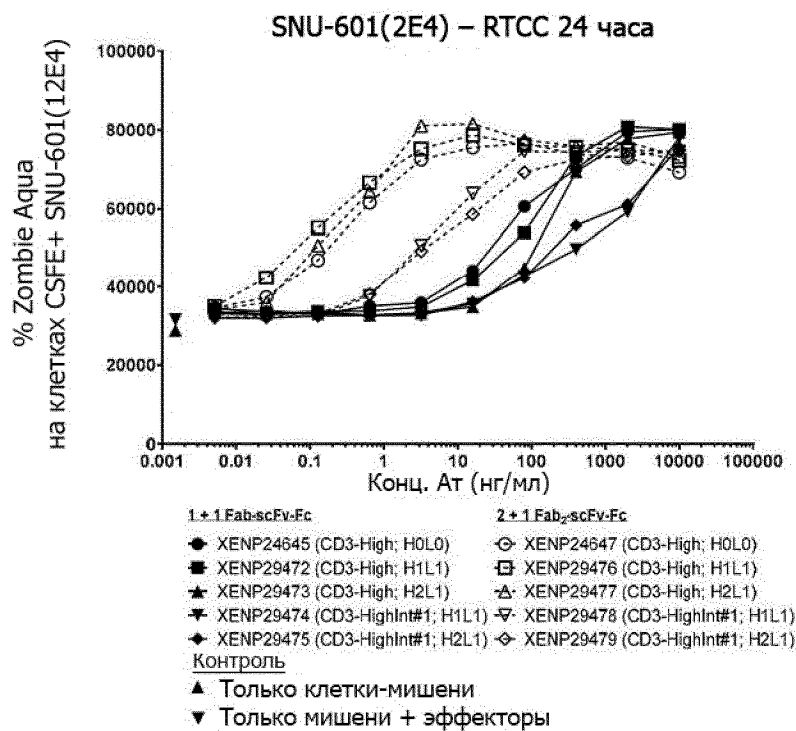
Фиг. 15



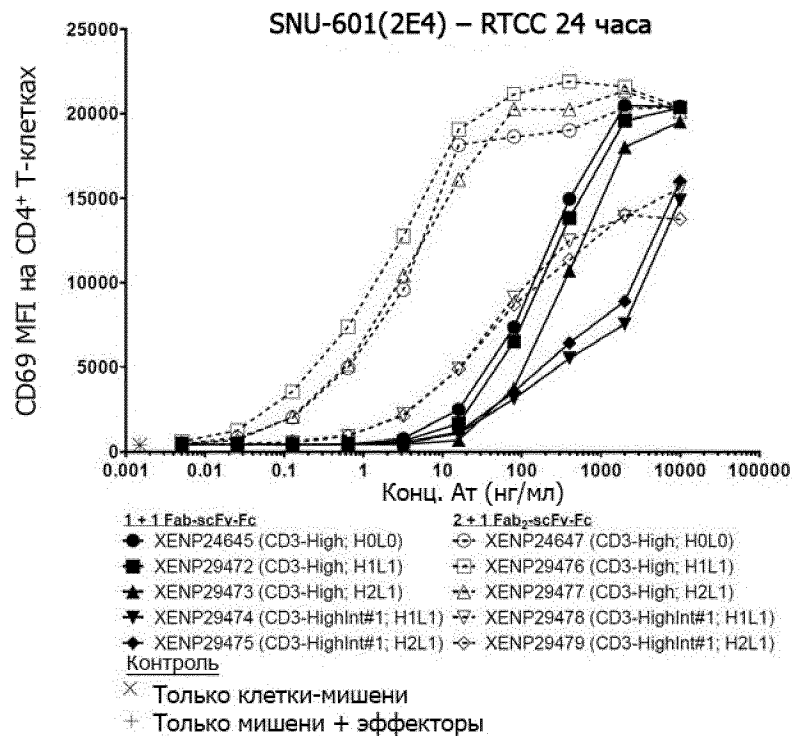
Фиг. 16А



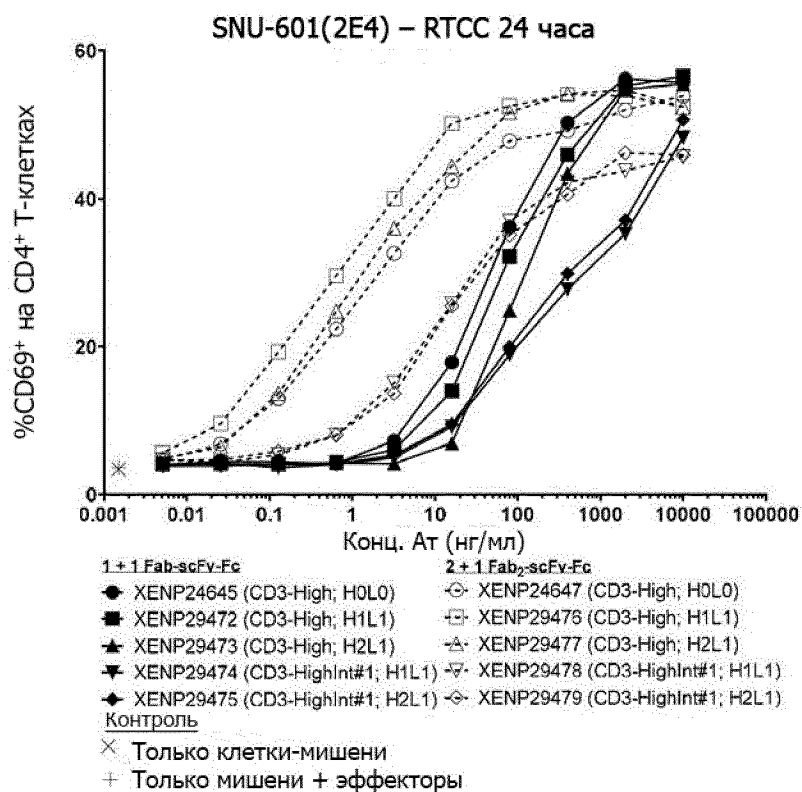
Фиг. 16В



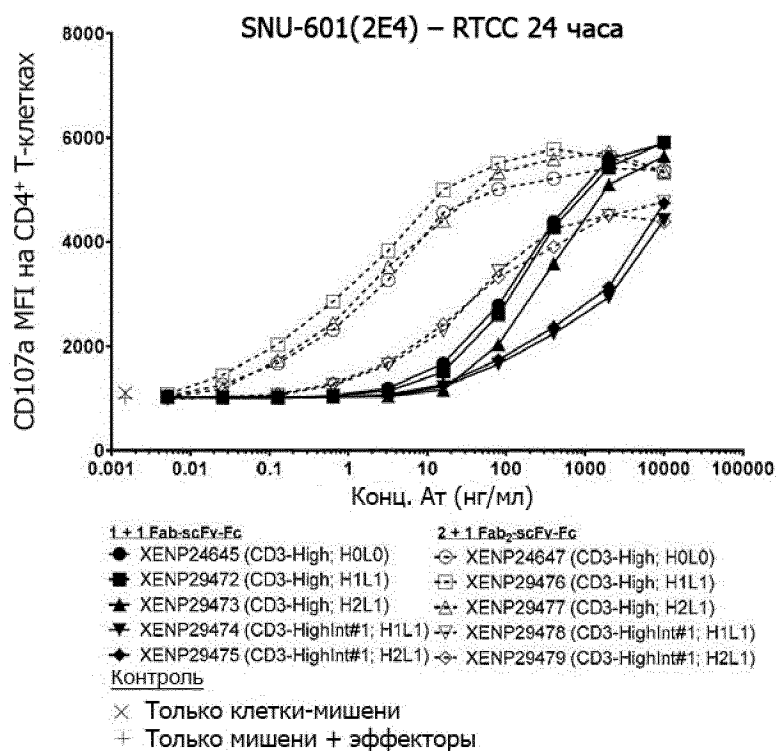
Фиг. 16С



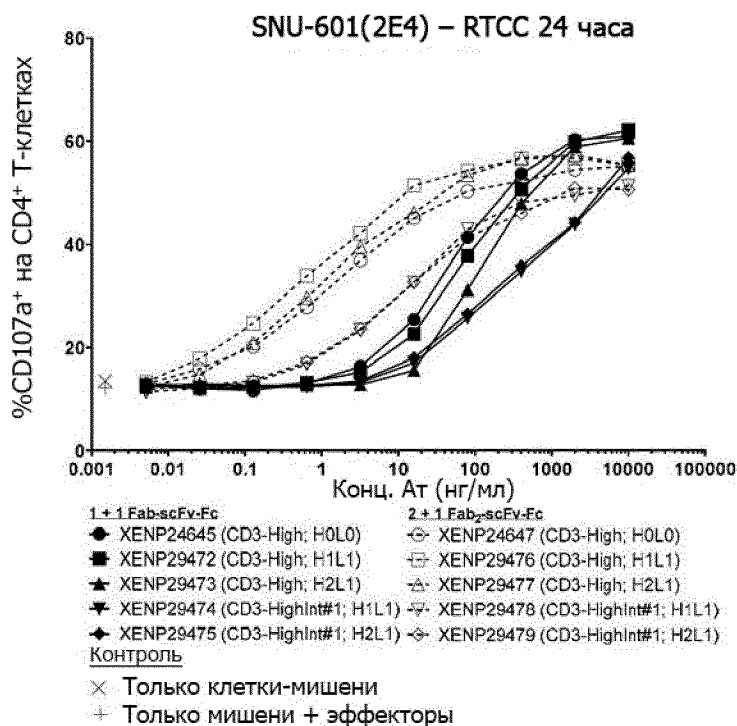
Фиг. 17А



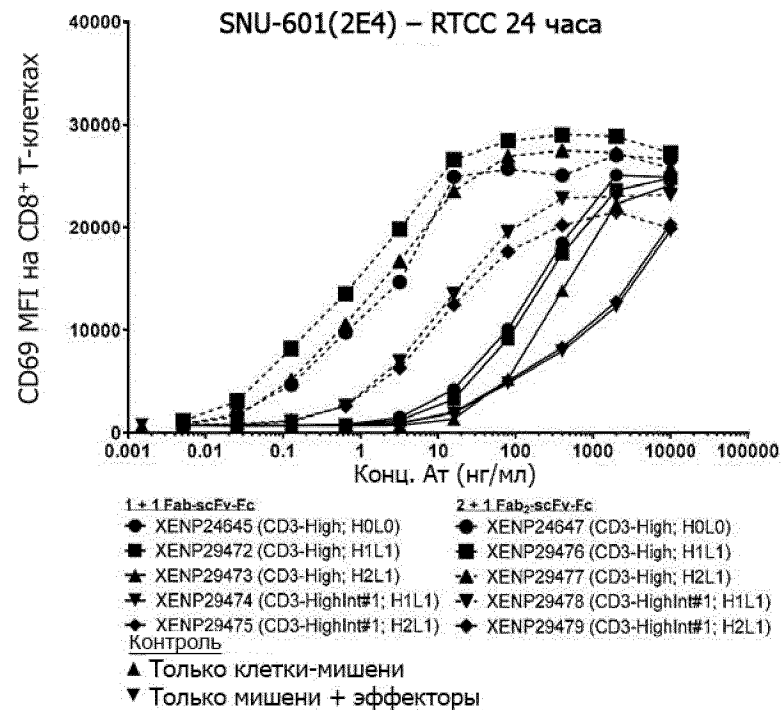
Фиг. 17В



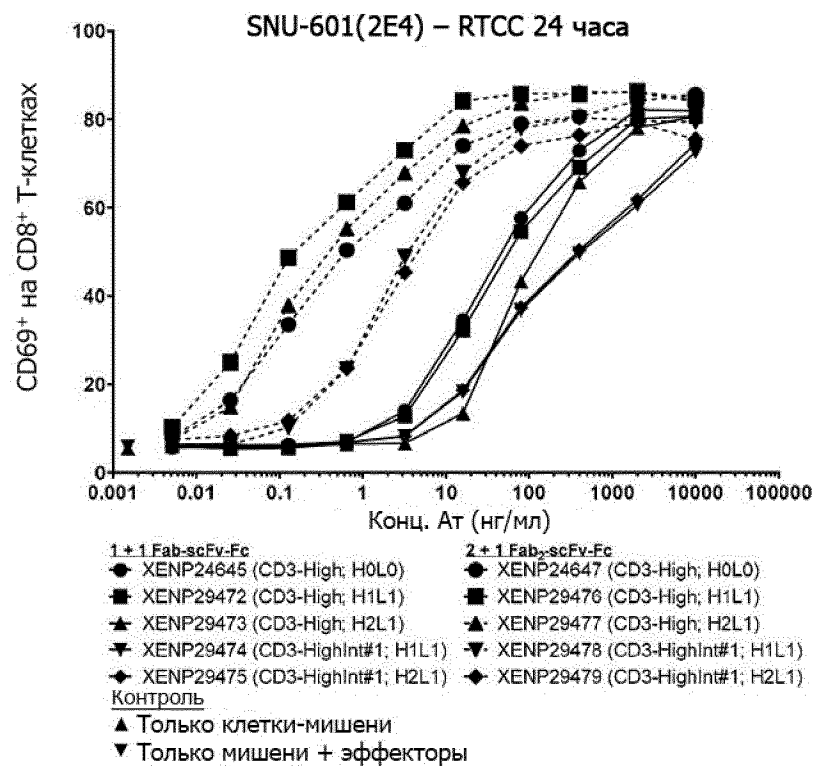
Фиг. 18А



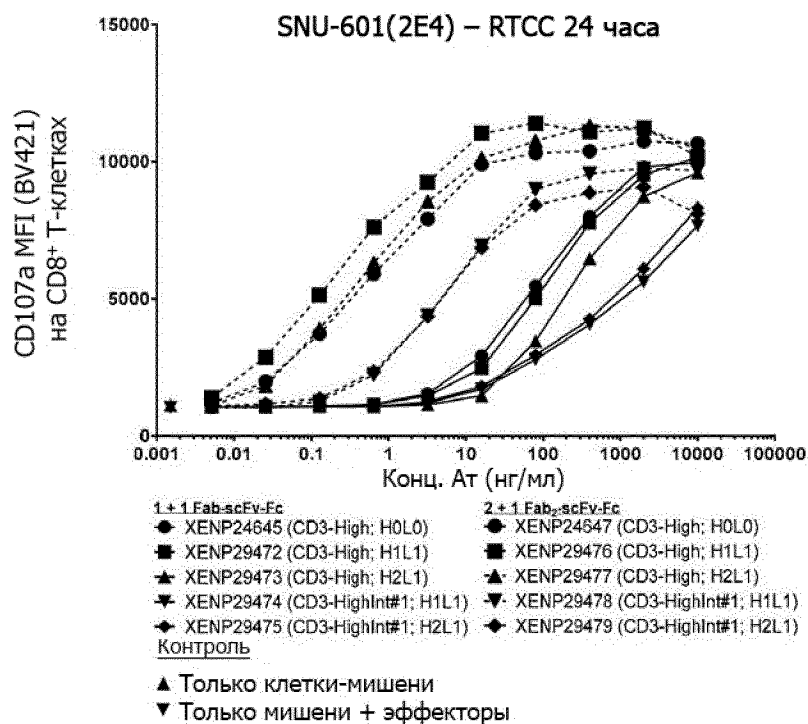
Фиг. 18В



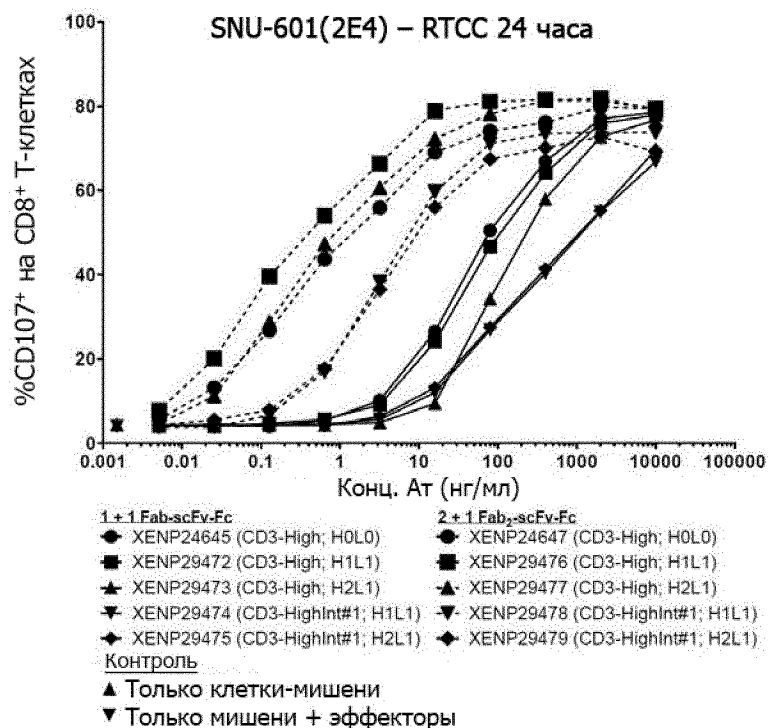
Фиг. 19А



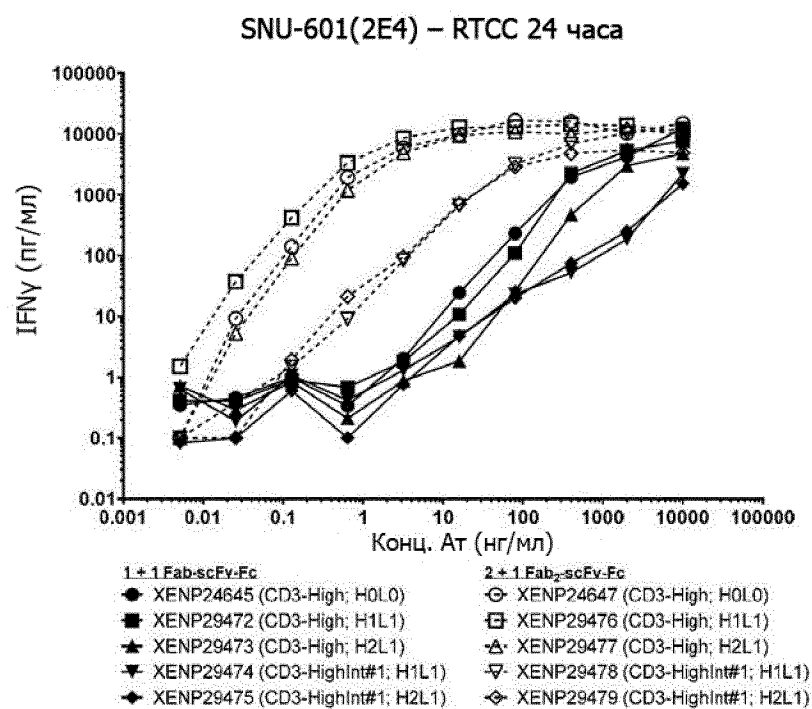
Фиг. 19В



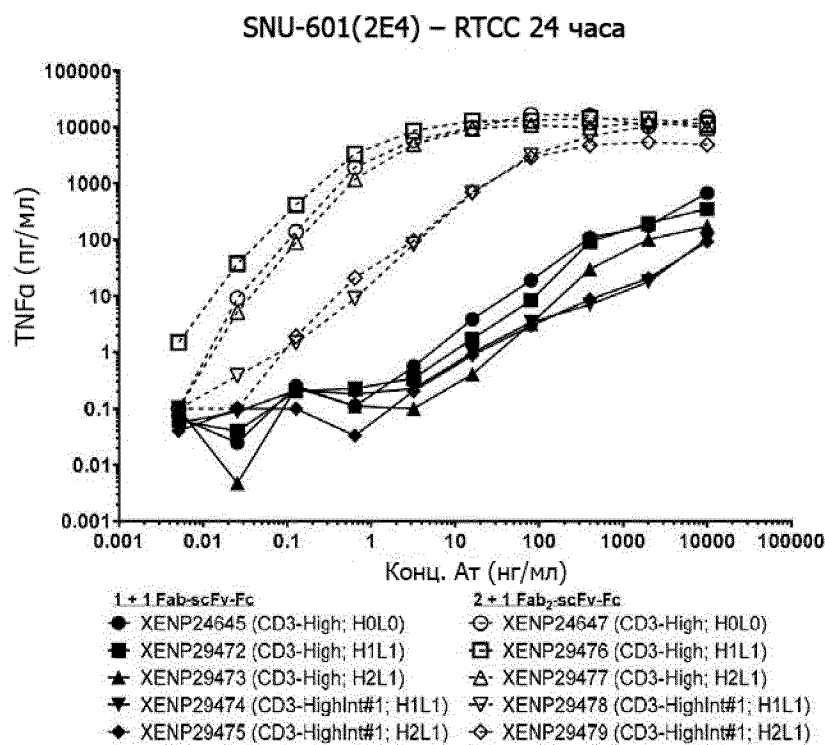
Фиг. 20А



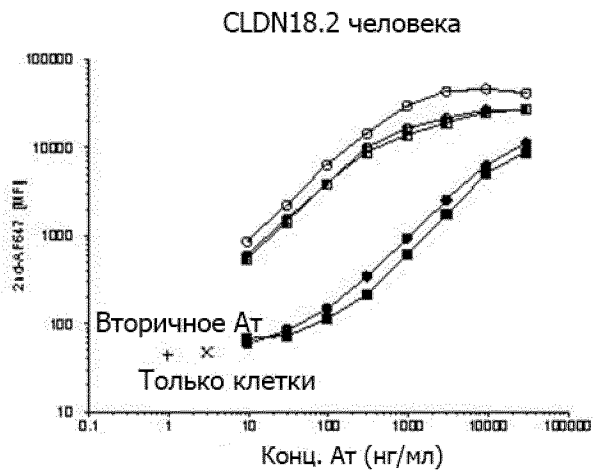
Фиг. 20В



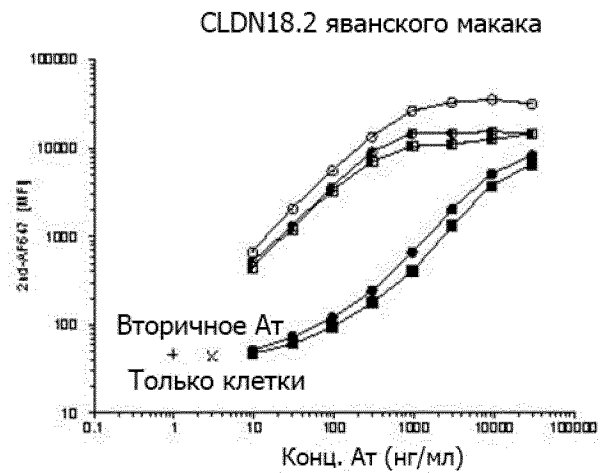
Фиг. 21А



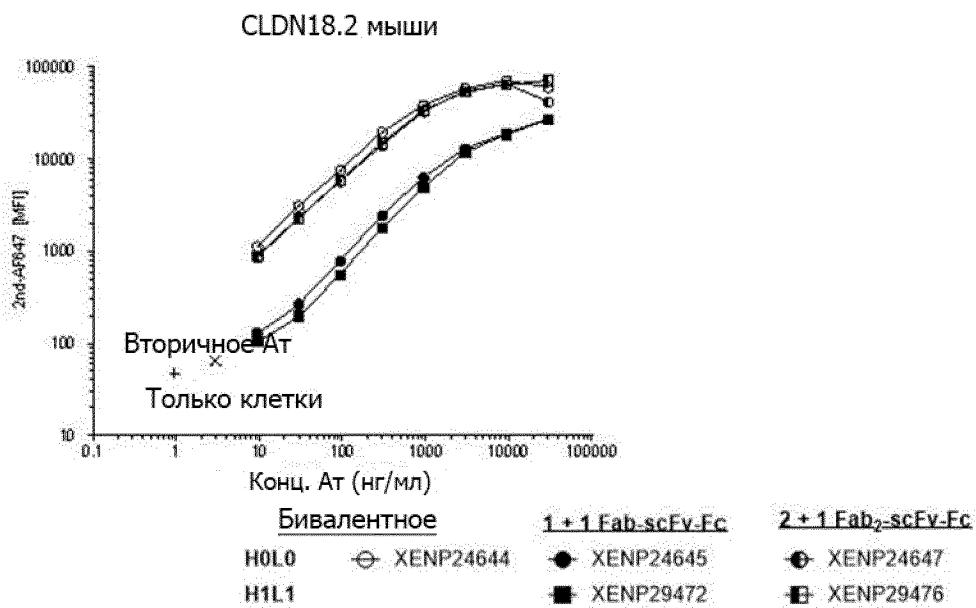
Фиг. 21В



Фиг. 22А



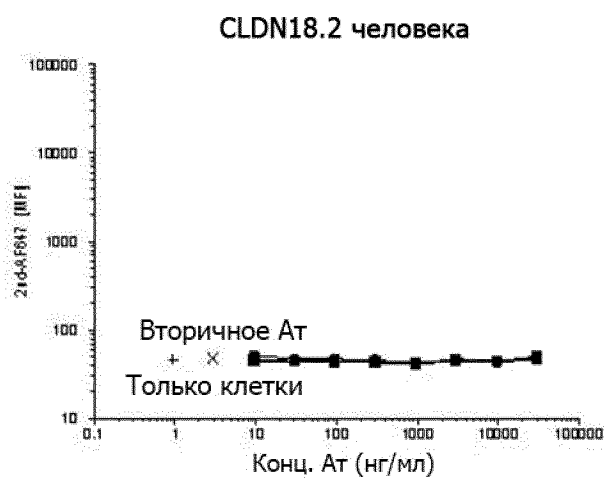
Фиг. 22В



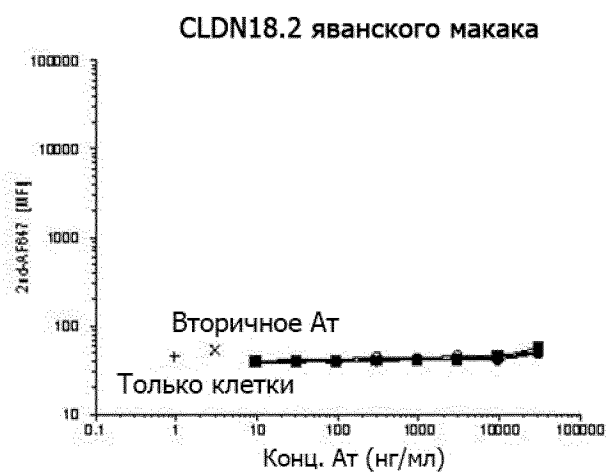
Фиг. 22С

<u>XENP</u>	<u>Клон</u>	<u>Антитело</u>	<u>hCLDN18.2</u> <u>EC50 (нМ)</u>	<u>cCLDN18.2</u> <u>EC50 (нМ)</u>	<u>mCLDN18.2</u> <u>EC50 (нМ)</u>
24644	H0L0	Бивалентное	4	3	5
24647	H0L0	2 + 1	4	1	3
29476	H1L1	2 + 1	6	2	6
24645	H0L0	1 + 1	145	108	35
29472	H1L1	1 + 1	146	142	43

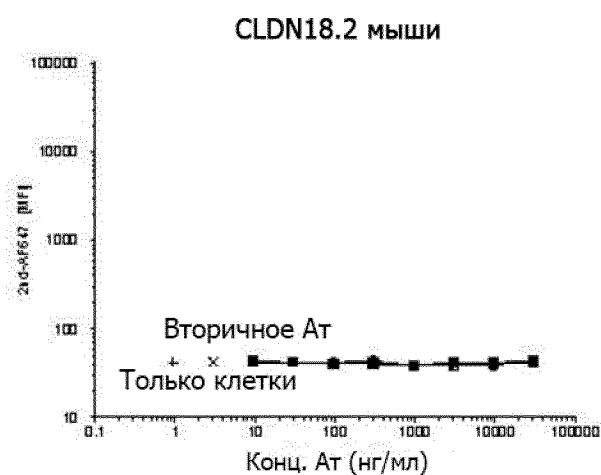
Фиг. 23



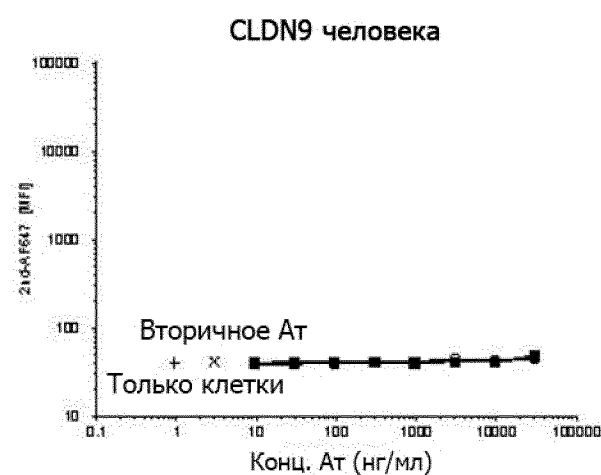
Фиг. 24А



Фиг. 24В

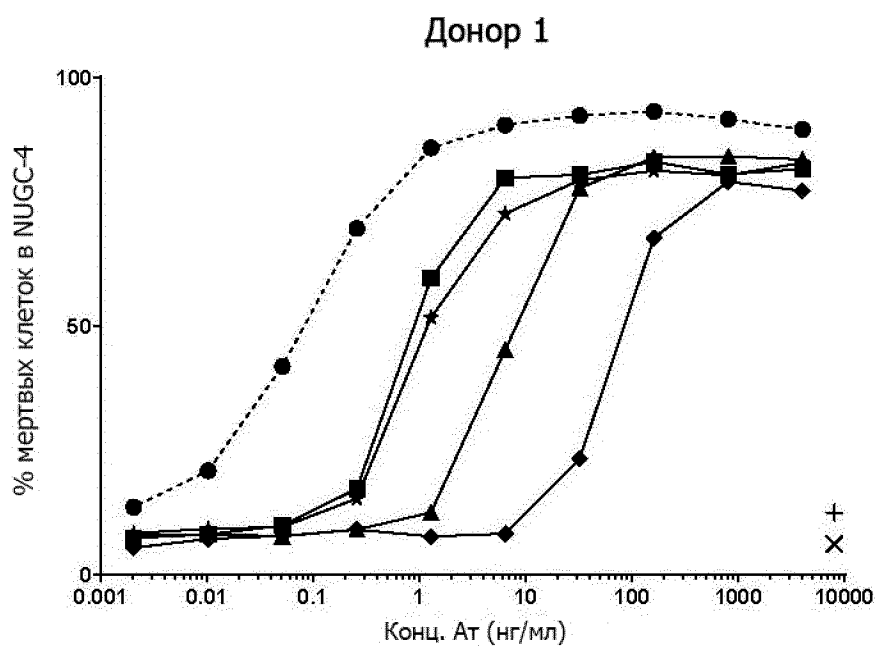


Фиг. 24С

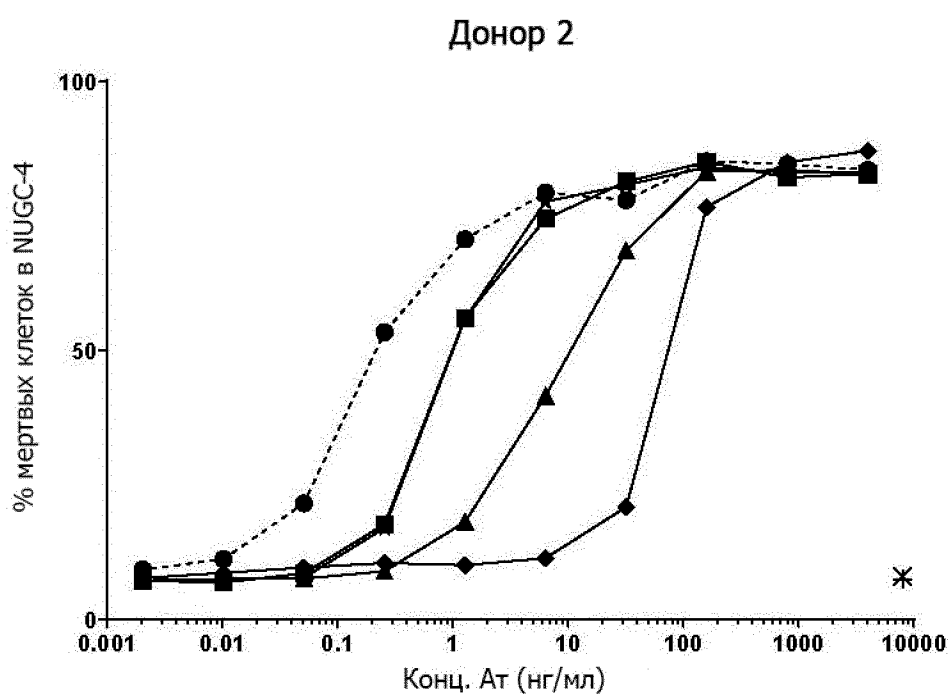


Фиг. 24D

	<u>Бивалентное</u>	<u>1 + 1 Fab₂-scFv-Fc</u>	<u>2 + 1 Fab₂-scFv-Fc</u>
H0L0	⊖ XENP24644	● XENP24645	⊖ XENP24647
H1L1		■ XENP29472	■ XENP29476

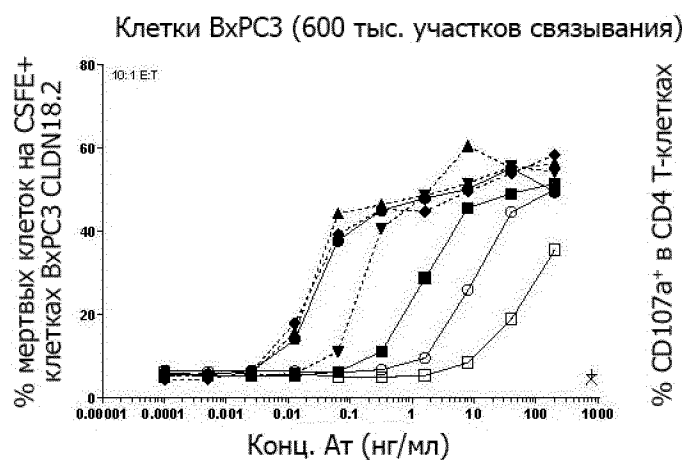


Фиг. 25А

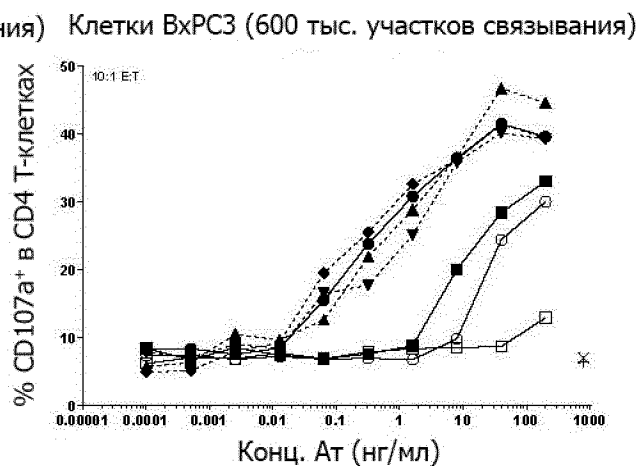


- | | |
|--|---|
| ● XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1 | ★ CLDN18.2 x CD3 AMG 910 |
| ■ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1 | × Только клетки-мишени |
| ▲ XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1 | + Только клетки-мишени + эффекторные клетки |
| ◆ XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1 | |

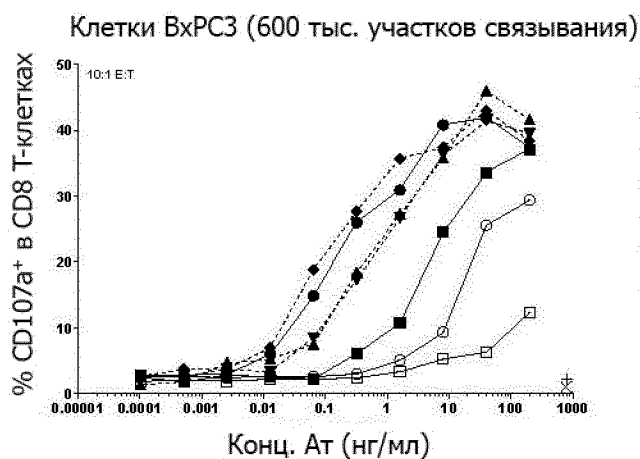
Фиг. 25В



Фиг. 26А

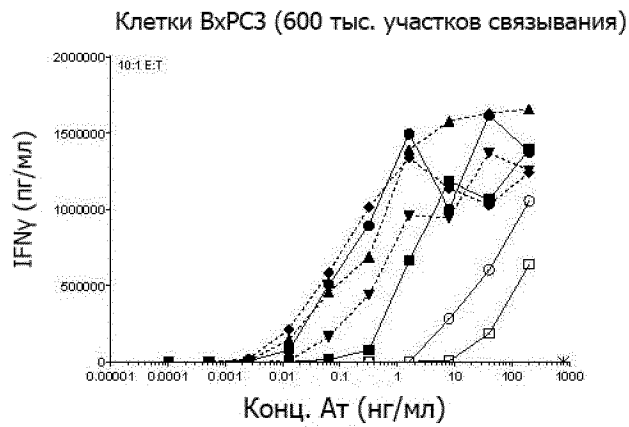


Фиг. 26В

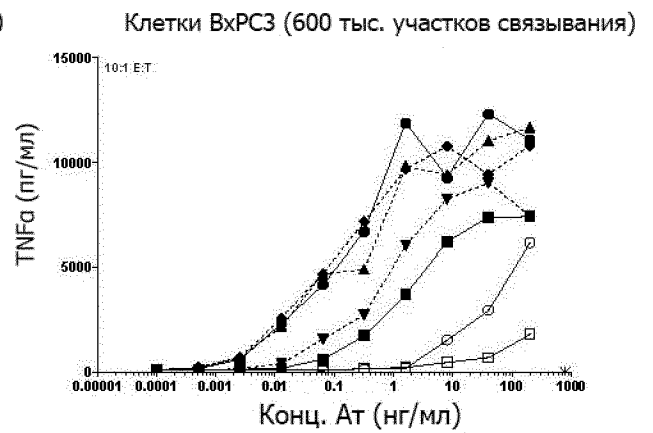


- XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки

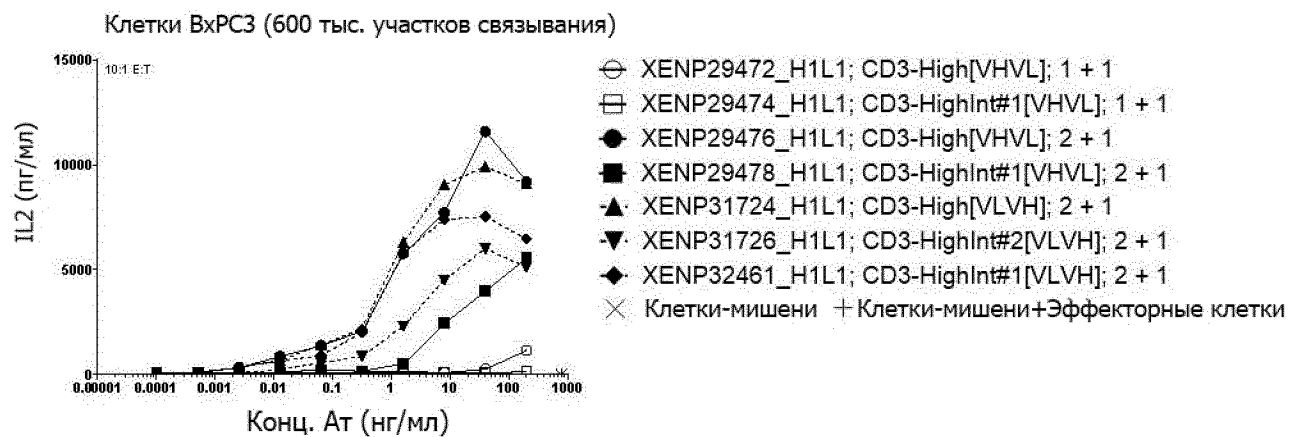
Фиг. 26С



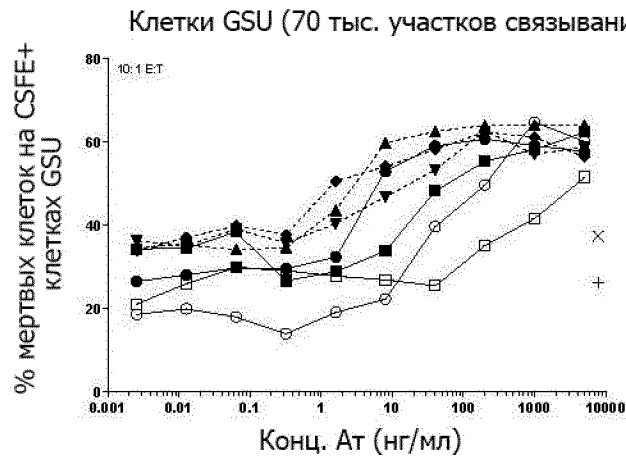
Фиг. 27А



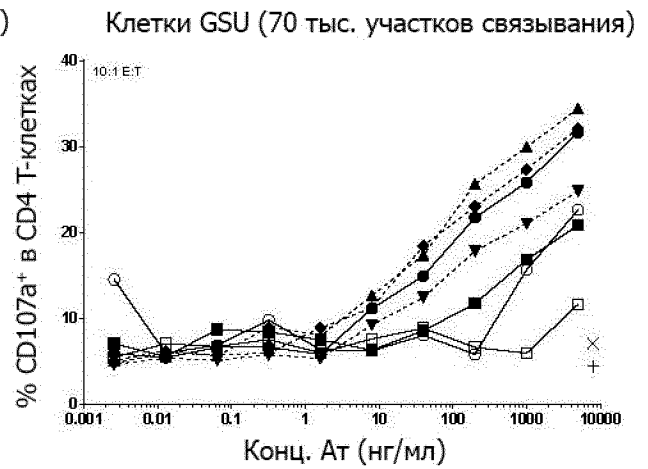
Фиг. 27В



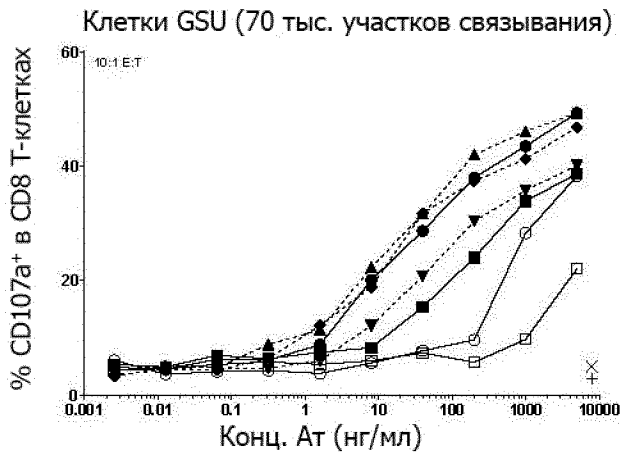
Фиг. 27С



Фиг. 28А

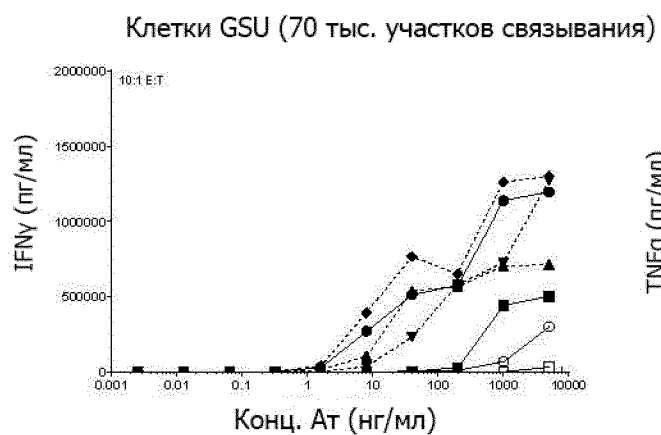


Фиг. 28В

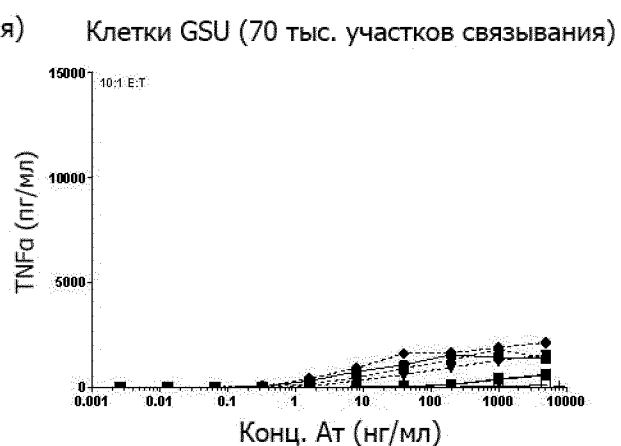


- XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки

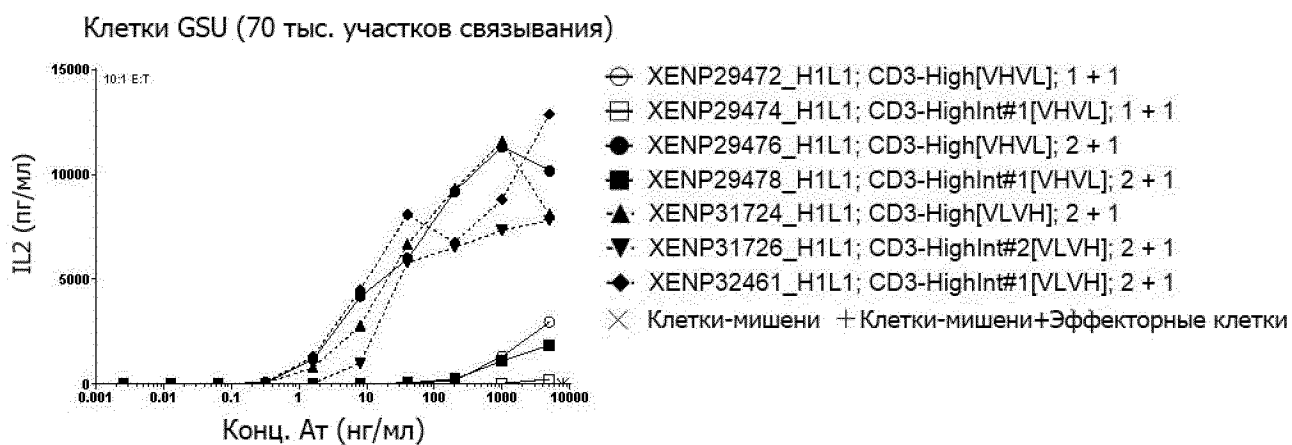
Фиг. 28С



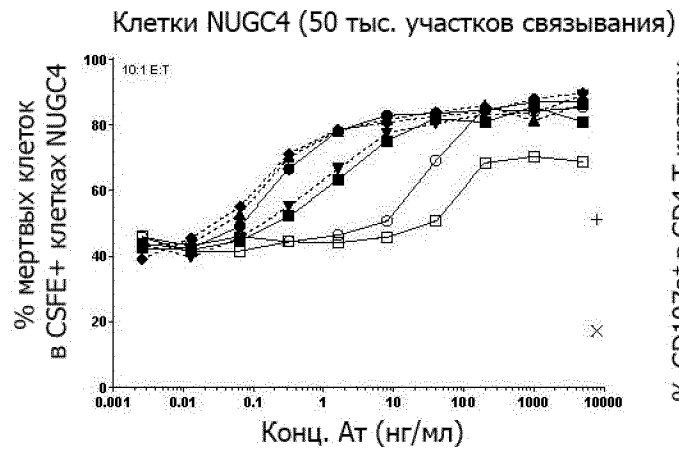
Фиг. 29А



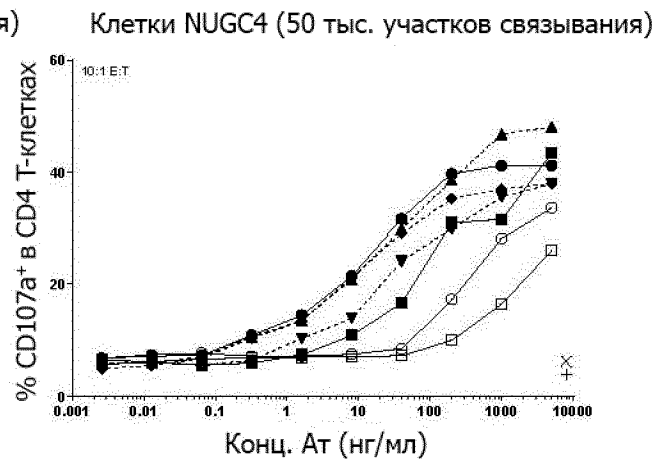
Фиг. 29В



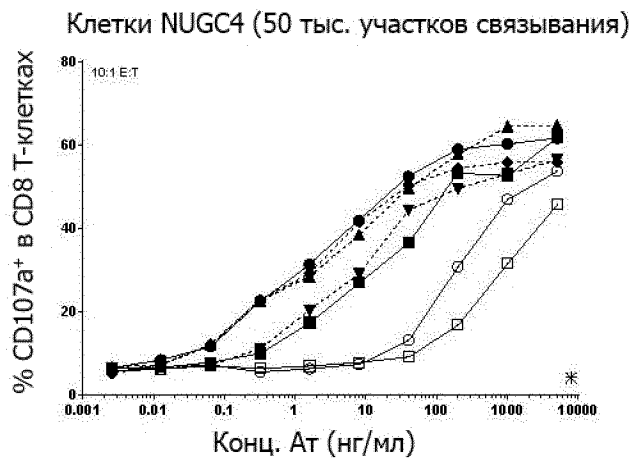
Фиг. 29С



Фиг. 30 А



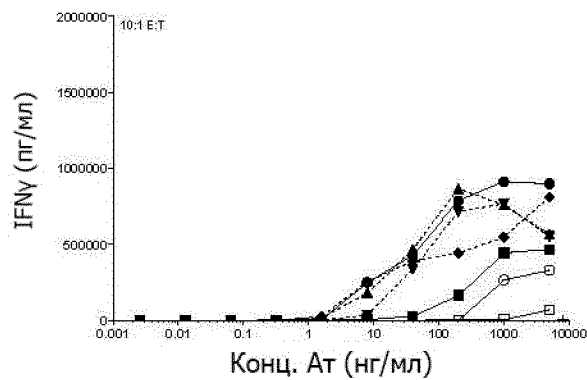
Фиг. 30В



Фиг. 30С

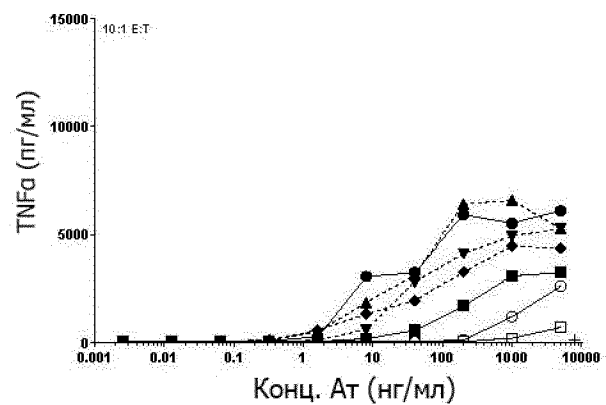
- XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки

Клетки NUGC4 (50 тыс. участков связывания)



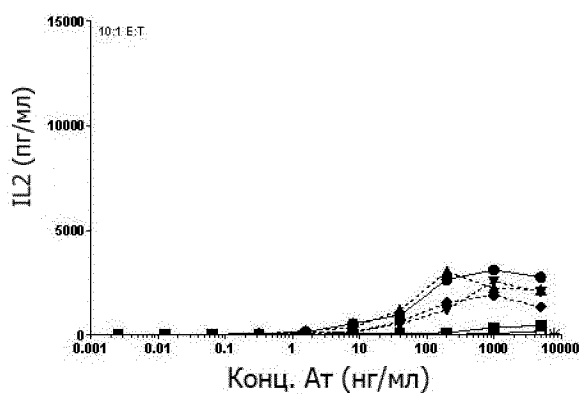
Фиг. 31А

Клетки NUGC4 (50 тыс. участков связывания)



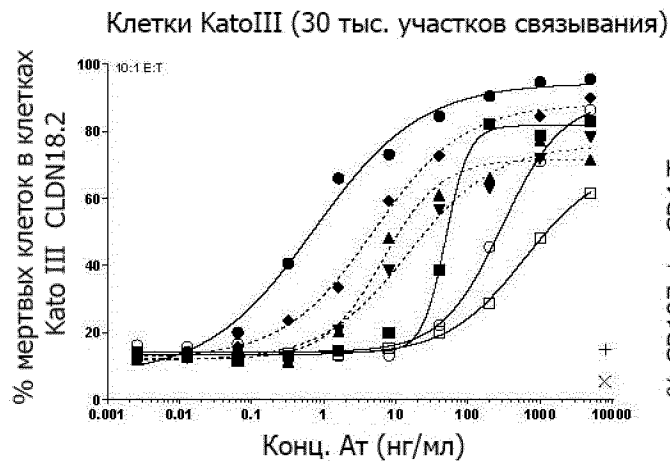
Фиг. 31В

Клетки NUGC4 (50 тыс. участков связывания)

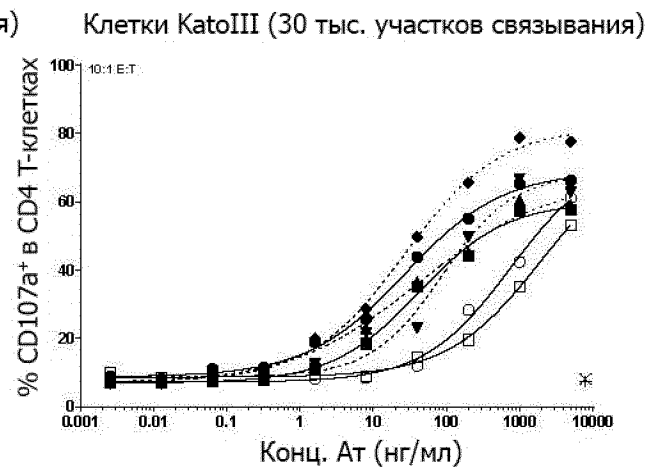


- ⊖ XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- ⊖ XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки

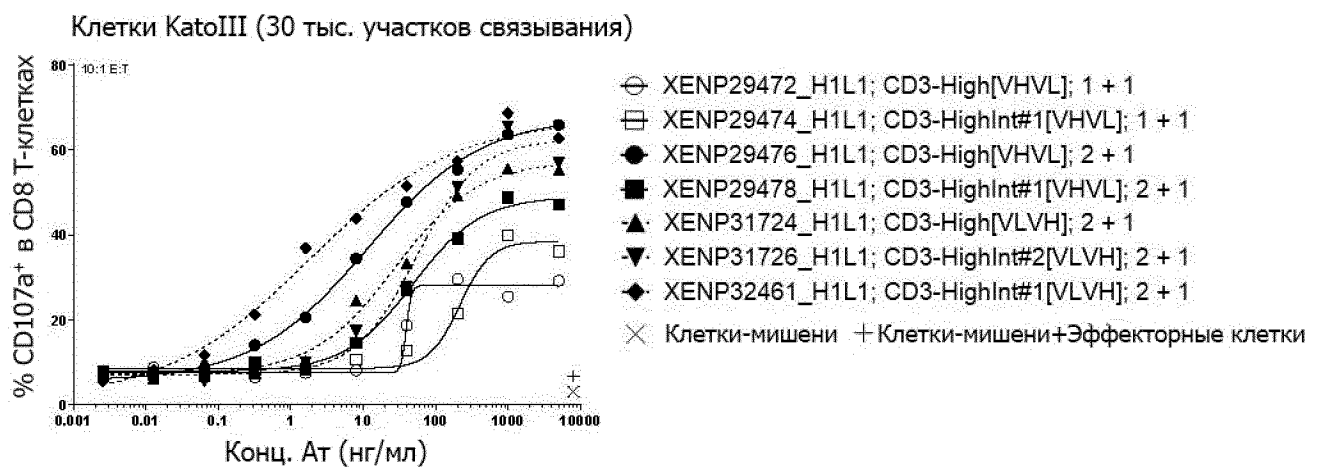
Фиг. 31С



Фиг. 32А



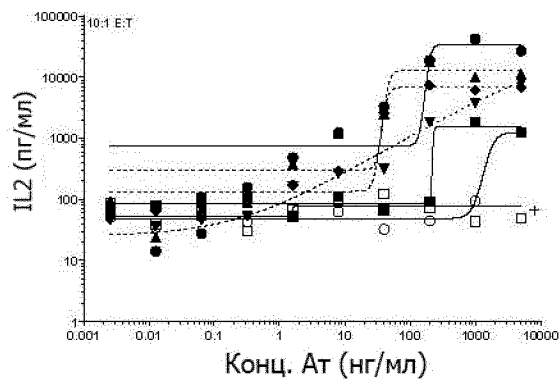
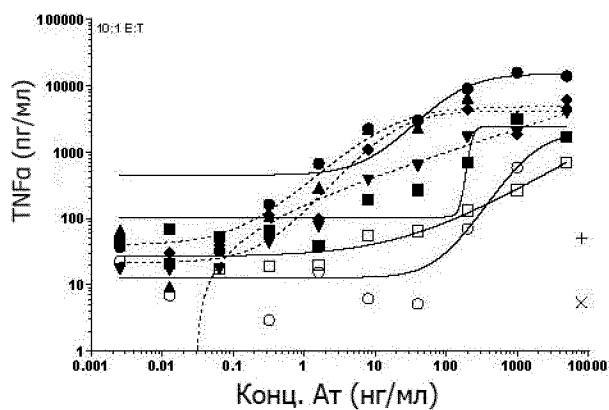
Фиг. 32В



Фиг. 32С

Клетки KatoIII (30 тыс. участков связывания)

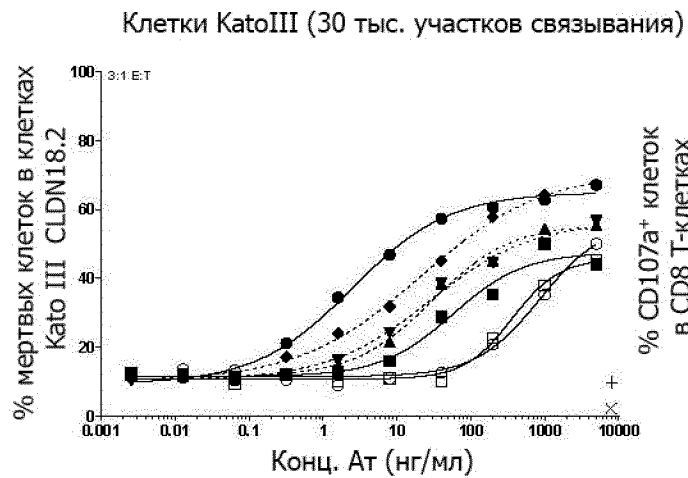
Клетки KatoIII (30 тыс. участков связывания)



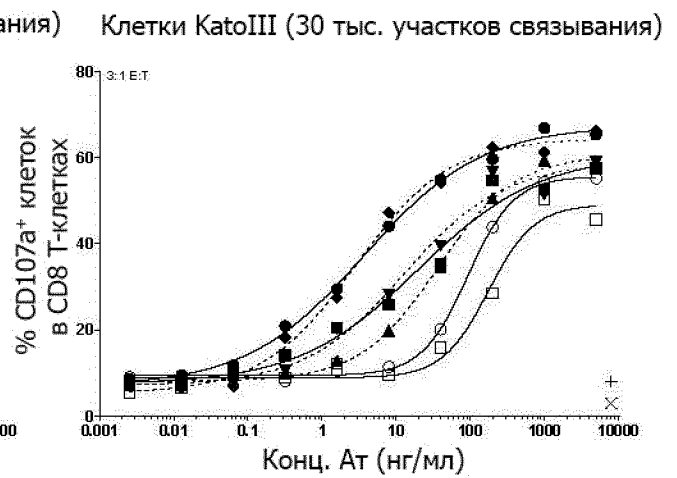
- ⊖ XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- ⊕ XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эфекторные клетки

Фиг. 33В

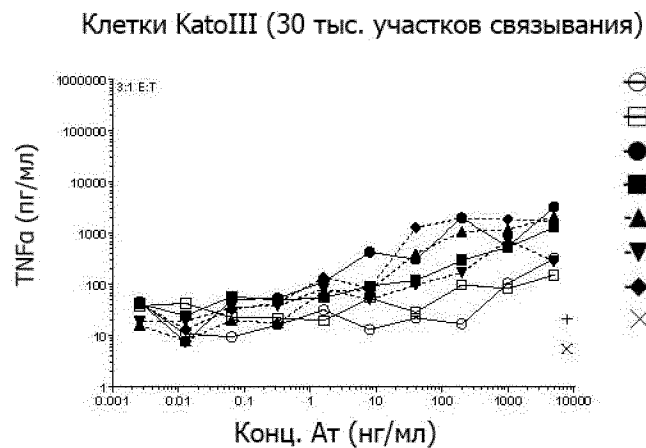
Фиг. 33А



Фиг. 34А

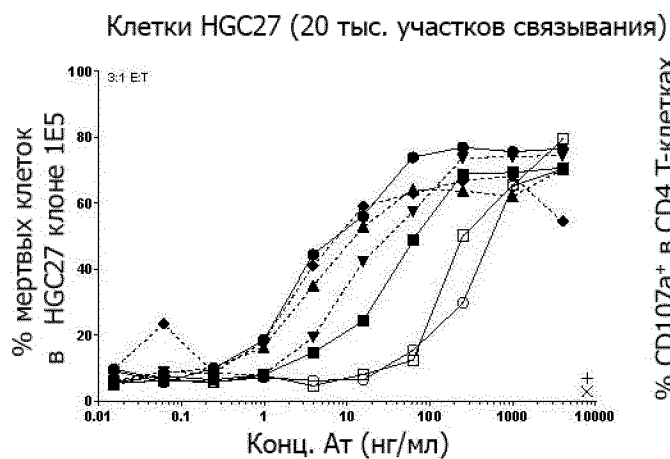


Фиг. 34В

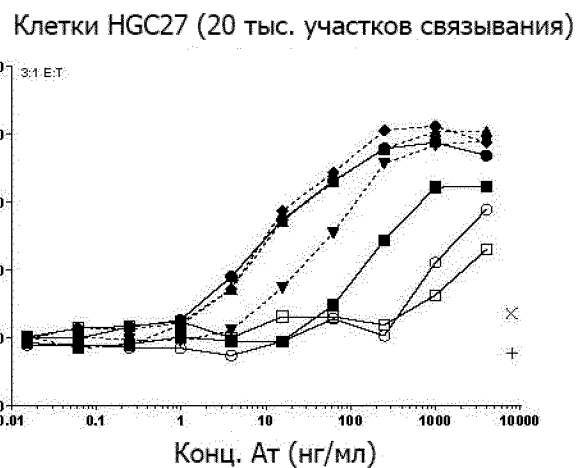


Фиг. 34С

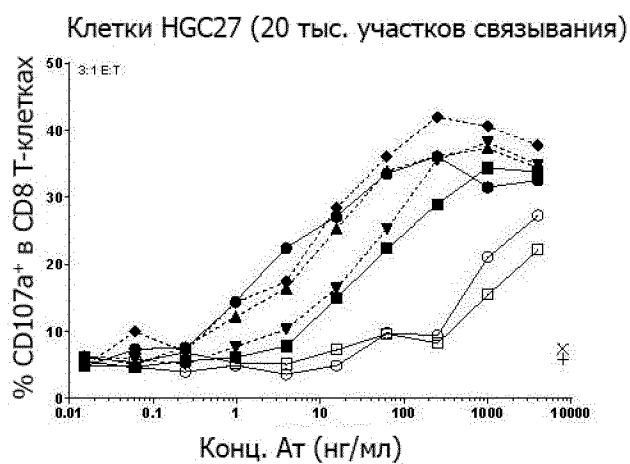
- XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки



Фиг. 35А

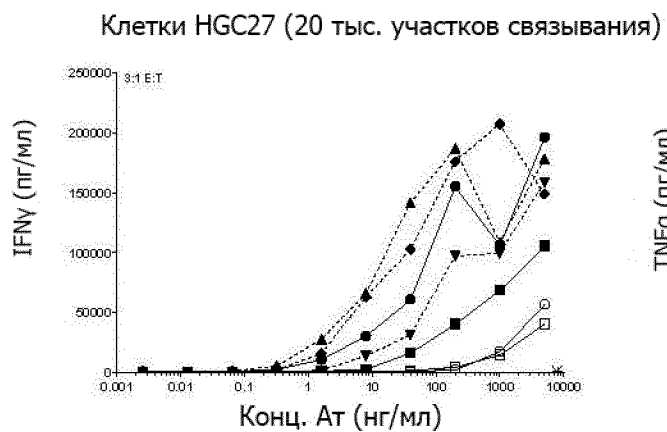


Фиг. 35В

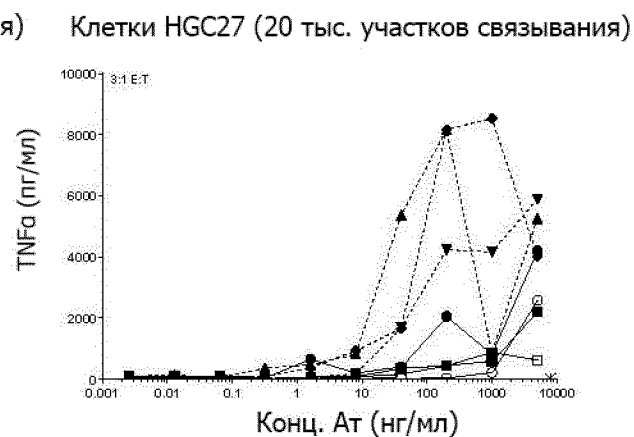


Фиг. 35С

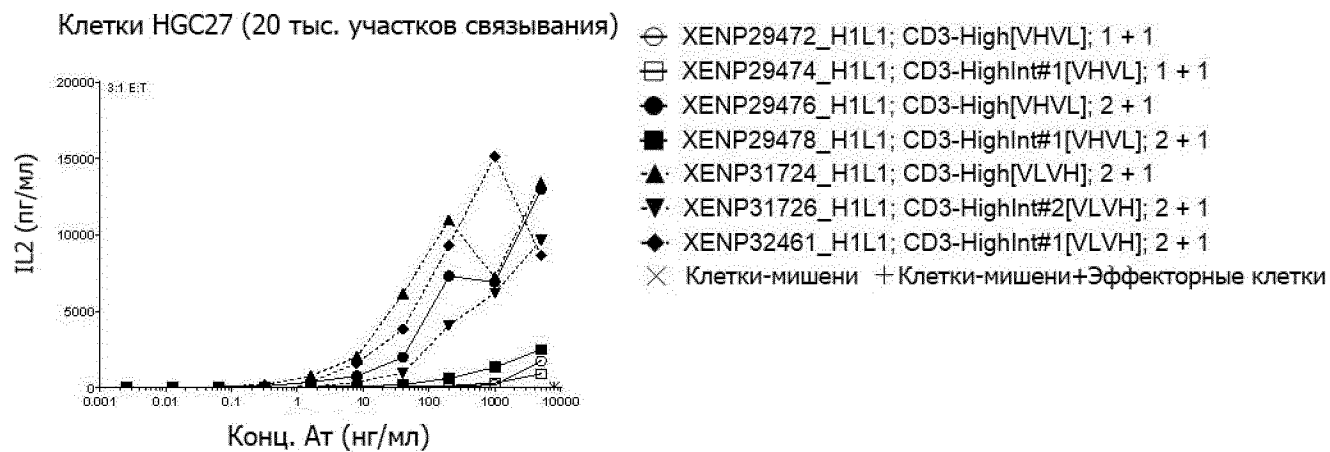
- XENP29472_H1L1; CD3-High[VHVL]; 1 + 1
- XENP29474_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 1 + 1
- XENP29476_H1L1; CD3-High[VHVL]; 2 + 1
- XENP29478_H1L1; CD3-HighInt#1[VHVL]; 2 + 1
- ▲ XENP31724_H1L1; CD3-High[VLVH]; 2 + 1
- ▼ XENP31726_H1L1; CD3-HighInt#2[VLVH]; 2 + 1
- ◆ XENP32461_H1L1; CD3-HighInt#1[VLVH]; 2 + 1
- × Клетки-мишени + Клетки-мишени+Эффекторные клетки



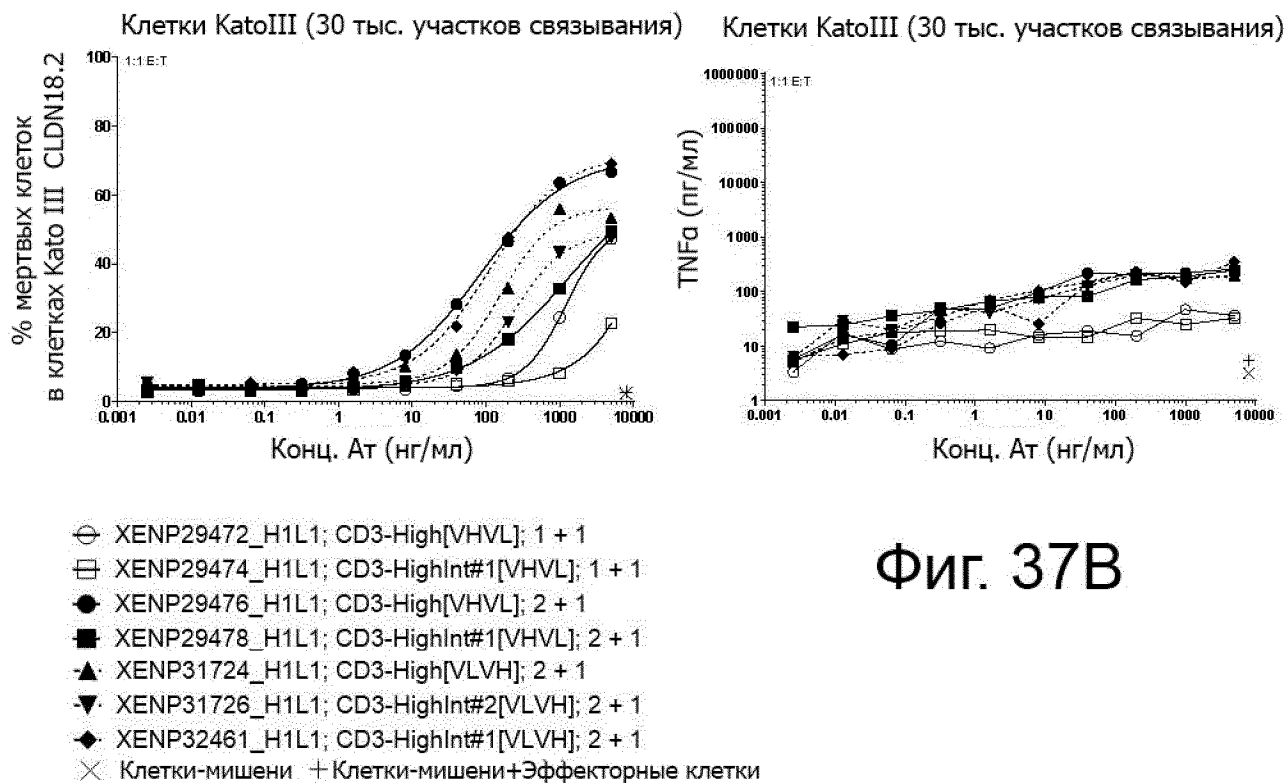
Фиг. 36А



Фиг. 36В

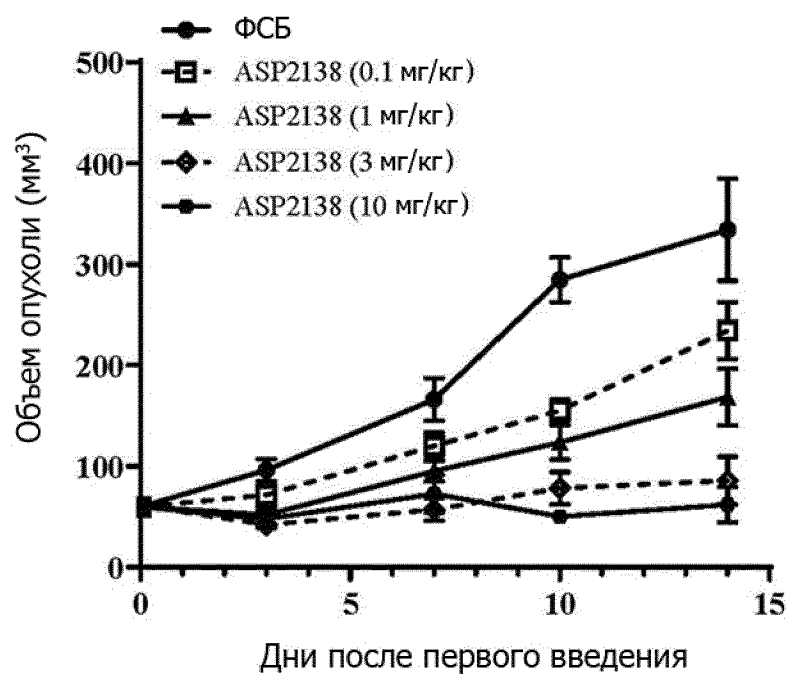


Фиг. 36С

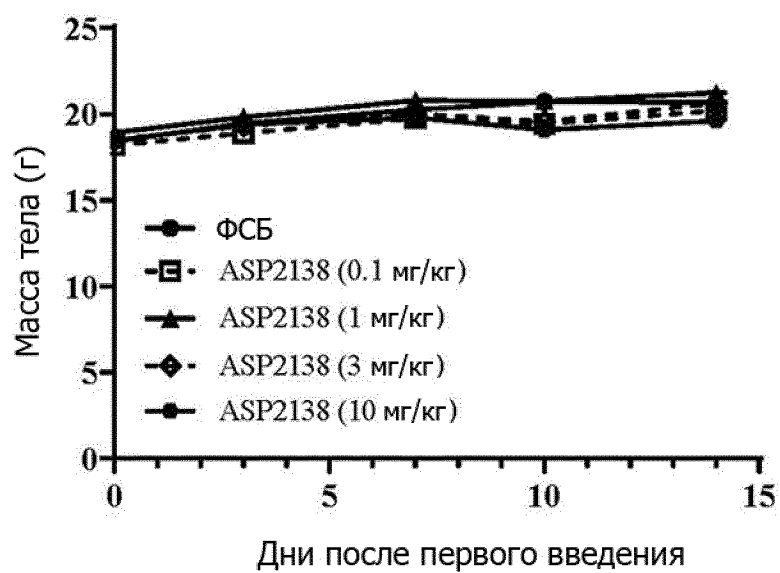


Фиг. 37В

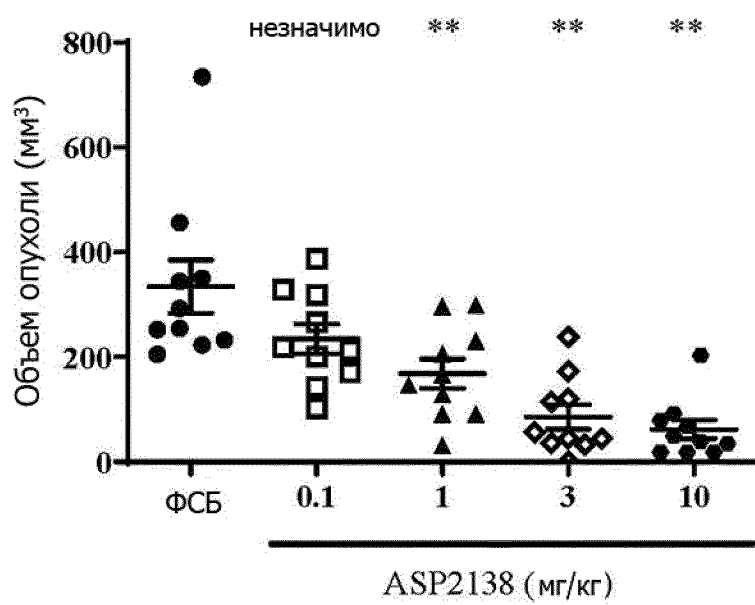
Фиг. 37А



Фиг. 38А



Фиг. 38В



Фиг. 38С