



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112012011143-4 B1**



**(22) Data do Depósito:** 11/11/2010

**(45) Data de Concessão:** 19/05/2020

**(54) Título:** "ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA CLAUDINA 6 (CLDN6)".

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/28; C07K 14/705; A61P 35/00; A61K 39/395.

**(30) Prioridade Unionista:** 06/07/2010 EP 10006956.6; 06/07/2010 US 61/361,618; 11/11/2009 US 61/260,202; 11/11/2009 EP 09014136.7.

**(73) Titular(es):** JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ; GANYMED PHARMACEUTICALS AG.

**(72) Inventor(es):** UGUR SAHIN; ÖZLEM TÜRECI; MICHAEL KOSLOWSKI; KORDEN WALTER; STEFAN WÖLL; MARIA KREUZBERG; BERND HUBNER; MICHAEL ERDELJAN.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2010006888 de 11/11/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2011/057788 de 19/05/2011

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 11/05/2012

**(57) Resumo:** Patente de Invenção para: "ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA CLAUDINA 6 (CLDN6)". A presente invenção fornece anticorpos úteis como agentes terapêuticos para o tratamento e/ou prevenção de doenças associadas com células que expressam claudina-6 (CLDN6), incluindo doenças relacionadas com o tumor, tais como câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de pele, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, sarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga urinário, câncer renal, câncer de cólon, coriocarcinoma da placenta, câncer cervical, câncer testicular e câncer uterino.

Relatório descritivo da Patente de Invenção para:  
**"ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA CLAUDINA 6 (CLDN6)".**

Os anticorpos foram introduzidos com sucesso na clínica para uso na terapia do câncer e surgiram como a  
5 terapêutica mais promissora em oncologia durante a última década. Terapias à base de anticorpos para o câncer têm o potencial de especificidade mais alta e menor perfil de efeitos colaterais em comparação com os fármacos convencionais. A razão é uma distinção precisa entre as  
10 células normais e neoplásicas pelos anticorpos e o fato de que seus modos de ação baseiam-se em mecanismos antitumorais imunológicos menos tóxicos, como ativação do complemento e recrutamento de células imunes citotóxicas.

Claudinas são proteínas integrais de membrana,  
15 localizadas dentro das junções firmes do epitélio e do endotélio. Claudinas são previstas como tendo quatro segmentos transmembrana com duas alças extracelulares e os N e C terminais localizados no citoplasma. A família de proteínas transmembranares da claudina (CLDN) desempenha um  
20 papel crítico na manutenção das junções firmes epitelial e endotelial e também podem desempenhar um papel na manutenção do citoesqueleto e na sinalização celular. A expressão diferencial destas proteínas entre as células tumorais e normais, além das suas localizações na membrana,

as torna alvos atrativos para a imunoterapia do câncer e o uso de terapias à base de anticorpo para o alvejamento de CLDNs na terapia do câncer promete um alto nível de especificidade terapêutica.

5        No entanto, a aplicação clínica de agentes terapêuticos direcionados para CLDN enfrenta vários obstáculos. A expressão ubíqua de CLDNs no corpo e o papel crítico das CLDNs na manutenção de junções firmes requer especificidade alvo de terapêuticas direcionadas à CLDN a  
10      fim de maximizar a especificidade do tratamento e minimizar a toxicidade sistêmica.

WO 2009/087978 refere-se aos anticorpos anti-CLDN6 e ao uso destes como agentes anticâncer. Em particular, os anticorpos monoclonais designados AB3-1, AE1-16, AE49-11 e  
15      AE3-20 são descritos. No entanto, nenhum destes anticorpos foi específico para CLDN6, como mostrado por análise FACS no Exemplo 5. O anticorpo AE3-20 reagiu com CLDN9, enquanto que os anticorpos AE1-16 e AE49-11 mostraram reatividade considerável com CLDN9 e também reagiram com CLDN4. A  
20      ligação do anticorpo AB3-1 à CLDN6 foi tão forte quanto sua ligação à CLDN9. É descrito no Exemplo 7 que o anticorpo AE49-11, quando administrado a um modelo de tumor de camundongo, tendeu a inibir o crescimento tumoral e teve um efeito de prolongamento de vida. Contudo, devido à

inespecificidade do anticorpo utilizado, ainda não está claro se os efeitos descritos são devido à ligação do anticorpo à CLDN6.

Assim, até o momento, nenhum anticorpo CLDN6-específico foi descrito que se liga seletivamente à superfície das células que expressam CLDN6. No entanto, tal anticorpo específico poderia ser necessário para abordagens terapêuticas baseadas em anticorpos utilizando CLDN6 como um alvo.

O alinhamento da sequência de CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9 mostrado na figura 1 ilustra que há um elevado grau de conservação de CLDN6 com as outras proteínas claudina. Esta homologia elevada de CLDN6 com outras proteínas claudina, em particular CLDN9 e CLDN4, e o facto de que WO 2009/087978 falhou em fornecer anticorpos específicos para CLDN6 sugerem que pode não ser possível produzir anticorpos que se ligam especificamente à CLDN6.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Os resultados experimentais aqui descritos confirmam que CLDN6 é expresso em diferentes células cancerosas humanas, enquanto que a expressão em tecidos normais é limitada à placenta.

Além disso, a presente invenção, pela primeira vez, descreve a produção bem sucedida de anticorpos específicos



para CLDN6 capazes de se ligarem à superfície de células íntegras que expressam CLDN6. Análises FACS de células íntegras que expressam CLDN6 mostraram a ligação específica de anticorpos anti-CLDN6, enquanto nenhuma ligação foi observada para as células que expressam outras proteínas claudina, em particular, CLDN3, CLDN4 e CLDN9, ou células que não expressam qualquer uma destas proteínas CLDN. Assim, a presente invenção demonstra inesperadamente que um anticorpo pode ser produzido especificamente realizando uma reação antígeno-anticorpo com CLDN6 na superfície das células que expressam CLDN6, mas não substancialmente realizando a reação antígeno-anticorpo com outras claudinas altamente homólogas.

A presente invenção fornece geralmente anticorpos úteis como agentes terapêuticos para o tratamento e/ou prevenção de doenças associadas com células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, incluindo doenças relacionadas com tumor, em particular câncer, tais como câncer de ovário, em particular adenocarcinoma de ovário e teratocarcinoma de ovário, câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular carcinoma de pulmão de células escamosas e adenocarcinoma,

câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, em particular carcinoma de célula basal e carcinoma de célula escamosa, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, em particular o carcinoma de células de transição e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de célula renal incluindo carcinoma renal de células claras e carcinoma celular papilar renal, câncer de cólon, câncer do intestino delgado, incluindo o câncer do íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma placentário, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, um tumor de células germinativas, tal como teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular um tumor de células germinativas do testículo, e as suas formas metastáticas.

Em um aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo que é capaz de se ligar à CLDN6 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN6. De preferência, o anticorpo não é substancialmente capaz de se ligar à CLDN9 associada

com a superfície de uma célula que expressa CLDN9. De preferência, o anticorpo não é substancialmente capaz de se ligar à CLDN4 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN4 e/ou não é substancialmente capaz de se ligar à CLDN3 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN3. Mais preferivelmente, o anticorpo não é substancialmente capaz de se ligar a uma proteína CLDN que não seja CLDN6 associada com a superfície de uma célula que expressa a dita proteína CLDN e é específica para CLDN6.

10 Preferivelmente, a dita célula que expressa a dita proteína CLDN é uma célula íntegra, em particular uma célula não permeabilizada, e a dita proteína CLDN associada com a superfície de uma célula tem uma conformação nativa, isto é, não desnaturada. De preferência, o anticorpo é capaz de

15 se ligar a um ou mais epítomos de CLDN6 nas suas conformações nativas.

Em uma modalidade, o anticorpo é capaz de se ligar a um epítopo localizado dentro de uma porção extracelular da CLDN6, em que a dita porção extracelular de CLDN6

20 compreende de preferência a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15, de preferência a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7, mais preferivelmente a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6. De preferência, o

anticorpo é capaz de se ligar a um epítopo localizado dentro da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15, de preferência a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 ou  
 5 SEQ ID NO: 7.

Em uma modalidade, o anticorpo é capaz de se ligar à CLDN6 por interação com pelo menos um, de preferência mais do que um, tal como 2, 3, 4 ou 5, de preferência todos os aminoácidos selecionados do grupo consistindo de Thr33,  
 10 Phe35, Gly37, Ser39, Ile40 e Leu151, de preferência através da interação com pelo menos um, de preferência mais do que um, de preferência todos os aminoácidos selecionados do grupo consistindo de Thr33, Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40, mais preferivelmente através da interação com pelo menos  
 15 um, de preferência mais do que um, de preferência todos os aminoácidos selecionados do grupo consistindo de Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40, ou consistindo de Thr33, Phe35, Gly37 e Ser39 e, em particular, através da interação com pelo menos um, de preferência mais do que um, de preferência  
 20 todos os aminoácidos selecionados do grupo consistindo de Phe35, Gly37 e Ser39. De preferência, o anticorpo não interage com um ou mais, de preferência todos os aminoácidos selecionados do grupo que consiste em Glu154, Ala155, Arg158 e Gly161 e, de preferência, não interage com

um ou mais, de preferência todos os aminoácidos selecionados do grupo que consiste em Arg158 e Gly161.

A interação entre um anticorpo e CLDN6, em particular na sua conformação nativa, pode ser analisada por uma  
5 mutagênese de varredura de alanina dos aminoácidos. Os  
mutantes de CLDN6 podem ser avaliados quanto à sua  
capacidade de ser ligados por anticorpos monoclonais  
específicos. A ligação prejudicada de um anticorpo  
monoclonal específico a um mutante CLDN6 sugere que o  
10 aminoácido modificado é um resíduo de contato importante. A  
ligação pode ser analisada, por exemplo, por citometria de  
fluxo.

Em uma modalidade, o anticorpo é obtível por um  
método compreendendo a etapa de imunização de um animal com  
15 um peptídeo com a sequência de aminoácidos de qualquer uma  
dentre as SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 e SEQ  
ID NO: 15, de preferência a sequência de aminoácidos de SEQ  
ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7, ou um peptídeo imunologicamente  
equivalente, ou um ácido nucleico ou célula hospedeira  
20 expressando o dito peptídeo.

Em modalidades diferentes, a CLDN6 a qual o anticorpo  
é capaz de se ligar tem a sequência de aminoácidos da SEQ  
ID NO: 2 ou a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. É  
particularmente preferido que o anticorpo seja capaz de se

ligar à CLDN6 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e capaz de se ligar à CLDN6 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende  
5 uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo pelo menos uma, de preferência duas, mais preferivelmente todas as três sequências de CDR de uma sequência de cadeia pesada de anticorpo selecionada dentre as SEQ ID NOs: 34, 36, 38 e 40, ou uma variante dessas. As sequências de CDR estão  
10 marcadas por uma caixa nas sequências de cadeia pesada de anticorpos acima mencionadas dadas na Figura 25.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência CDR3 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, em que Xaa1 é qualquer  
15 aminoácido, de preferência um aminoácido aromático, mais preferivelmente Phe ou Tyr, mais preferivelmente Tyr, Xaa2 é qualquer aminoácido, de preferência um aminoácido aromático, mais preferivelmente Phe ou Tyr, mais preferivelmente Tyr, e Xaa3 é qualquer aminoácido, de  
20 preferência Leu ou Phe, mais preferivelmente Leu. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 ou Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são como definidos acima. Em uma

modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são como definidos acima. Em uma modalidade, um anticorpo da  
5 invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência CDR3 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são como definidos acima. Em uma modalidade, um anticorpo de acordo com as modalidades anteriores compreende uma cadeia pesada  
10 de anticorpo compreendendo a sequência CDR1 de acordo com a SEQ ID NO: 47 ou uma variante sua e/ou a sequência CDR2, de acordo com a SEQ ID NO: 48 ou uma variante sua.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo uma sequência  
15 de cadeia pesada de anticorpo selecionada dentre as SEQ ID NOs: 34, 36, 38 e 40 ou uma variante das mesmas.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia leve de anticorpo que compreende pelo menos uma, de preferência duas, mais preferivelmente todas as três  
20 sequências CDR de uma sequência da cadeia leve de anticorpo selecionada dentre as SEQ ID NOs: 35, 37, 39 e 41, ou uma variante das mesmas. As sequências CDR estão marcadas por uma caixa nas sequências de cadeia leve de anticorpo mencionadas acima apresentadas na figura 26.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia leve de anticorpo, que compreende a sequência CDR3 Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, de preferência Ser ou Asn, mais preferivelmente Ser, Xaa2 é qualquer aminoácido, de preferência Tyr, Ser, Ile, Asn ou Thr, mais preferivelmente Tyr, Ser ou Asn, mais preferivelmente Asn, e Xaa3 é qualquer aminoácido, de preferência Ser ou Tyr, mais preferivelmente Tyr. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia leve de anticorpo que compreende a sequência CDR3 Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são como definidos acima. Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência CDR3 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, em que Xaa1, Xaa2 e Xaa3 são como definidos acima. Em uma modalidade, um anticorpo de acordo com as modalidades precedentes compreende uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência CDR1 de acordo com a SEQ ID NO: 52 ou uma variante sua e/ou a sequência CDR2, de acordo com a SEQ ID NO: 53 ou uma variante sua.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia leve de anticorpo compreendendo uma sequência de cadeia leve de anticorpo selecionada dentre as SEQ ID NOS: 35, 37, 39 e 41, ou uma variante das mesmas.



Em várias modalidades, um anticorpo da invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo tal como discutido acima e uma cadeia leve de anticorpo como também discutido acima.

5        Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende:

(i) uma cadeia pesada de anticorpo que compreende pelo menos uma, de preferência duas, mais preferivelmente todas as três sequências CDR de uma sequência de cadeia pesada de  
10 anticorpo da SEQ ID NO: x, ou uma variante sua, e

(ii) uma cadeia leve de anticorpo que compreende pelo menos uma, de preferência duas, mais preferivelmente todas as três sequências CDR de uma sequência da cadeia leve de anticorpo da SEQ ID NO: x+1, ou uma variante sua;

15        em que x é selecionado de 34, 36, 38 e 40.

As sequências CDR estão marcadas por uma caixa nas sequências de cadeia pesada de anticorpo e nas sequências de cadeia leve de anticorpo, respectivamente mencionadas acima, apresentadas na Figura 25 e na Figura 26,  
20 respectivamente.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção compreende:

(i) uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo de Xaa1 Gly

Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, e Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, de preferência um aminoácido aromático, mais preferivelmente Phe ou Tyr, mais preferivelmente Tyr, Xaa2 é qualquer aminoácido, de preferência um aminoácido aromático, mais preferivelmente Phe ou Tyr, mais preferivelmente Tyr, e Xaa3 é qualquer aminoácido, de preferência Leu ou Phe, mais preferivelmente Leu, e

10 (ii) uma cadeia leve de anticorpo compreendendo uma sequência CDR3 selecionada do grupo consistindo de Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, em que Xaa1 é qualquer aminoácido, de preferência Ser ou Asn, mais preferivelmente Ser, Xaa2 é qualquer aminoácido, preferivelmente Tyr, Ser, 15 Ile, Asn ou Thr, mais preferivelmente Tyr, Ser ou Asn, mais preferivelmente Asn, e Xaa3 é qualquer aminoácido, de preferência Ser ou Tyr, mais preferivelmente Tyr.

Em uma modalidade, um anticorpo de acordo com as 20 modalidades precedentes compreende (i) uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência CDR1 de acordo com a SEQ ID NO: 47 ou uma variante sua e/ou a sequência CDR2 de acordo com a SEQ ID NO: 48 ou uma variante sua e/ou (ii) uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência CDR1

de acordo com a SEQ ID NO: 52 ou uma variante sua e/ou a sequência CDR2 de acordo com a SEQ ID NO: 53 ou uma variante sua.

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção  
5 compreende:

(i) uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo uma sequência de cadeia pesada de anticorpo da SEQ ID NO: x ou uma variante sua, e

(ii) uma cadeia leve de anticorpo compreendendo uma  
10 sequência de cadeia leve de anticorpo da SEQ ID NO: x+1 ou uma variante sua;

em que x é selecionado de 34, 36, 38 e 40.

Em modalidades preferidas, o anticorpo tem uma ou mais das seguintes atividades: (i) morte de uma célula que  
15 expressa CLDN6, (ii) inibição da proliferação de uma célula que expressa CLDN6, (iii) inibição da formação de colônias de uma célula que expressa CLDN6, (iv) mediação da remissão, isto é, redução em tamanho, de preferência remissão completa, isto é, desaparecimento completo de  
20 tumores estabelecidos, (v) prevenção da formação ou re formação de tumores e (vi) inibição da metástase de uma célula que expressa CLDN6. Deste modo, o anticorpo pode ser utilizado para um ou mais dos precedentes, em particular quando administrado a um paciente. Tal morte das células

e/ou inibição de uma ou mais atividades de células podem ser utilizadas terapeuticamente como descrito no presente documento. Em particular, a morte de células, a inibição da proliferação das células e/ou inibição de formação de colônias das células podem ser utilizadas para tratar ou prevenir o câncer, incluindo metástases do câncer. A inibição de proliferação, formação de colônias e/ou metástase de células pode ser utilizada, em particular, para tratar ou prevenir a metástase do câncer e o espalhamento da metástase das células cancerosas. De preferência, o anticorpo da invenção medeia a morte das células através da indução de lise mediada pela citotoxicidade dependente do complemento (CDC), lise mediada pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), apoptose, adesão homotípica e/ou fagocitose, de preferência através da indução de lise mediada por CDC e/ou lise mediada por ADCC. No entanto, a presente invenção também inclui modalidades em que o anticorpo exerce a sua atividade como aqui descrito, tal como matando as células e/ou inibindo uma ou mais atividades das células, por exemplo, proliferação celular e/ou formação de colônias, sem induzir a lise mediada por citotoxicidade dependente do complemento (CDC), a lise mediada por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), apoptose, adesão

homotípica e/ou fagocitose. Por exemplo, o anticorpo da invenção pode também exercer um efeito simplesmente pela ligação à CLDN6 na superfície da célula, deste modo, por exemplo, bloqueando a proliferação das células. Em uma  
5 modalidade, o anticorpo da invenção não induz a lise das células mediada por CDC.

De preferência, a lise das células mediada por ADCC ocorre na presença de células efetoras que, em modalidades particulares, são selecionadas do grupo que consiste de  
10 monócitos, células mononucleares, células NK e PMNs, e a fagocitose é por meio de macrófagos.

A atividade de inibição ou redução da proliferação de células que expressam CLDN6, de preferência células cancerosas, pode ser medida *in vitro* por determinação da  
15 proliferação de células cancerosas expressando CLDN6 em um ensaio usando bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU é um nucleosídeo sintético que é um análogo da timidina e pode ser incorporado no DNA recém sintetizado de células de replicação (durante a fase S do ciclo celular),  
20 substituindo por timidina durante a replicação do DNA. A detecção da substância química incorporada utilizando, por exemplo, anticorpos específicos para BrdU indica células que estavam replicando ativamente o seu DNA.

A atividade de inibição ou redução da formação de

colônias das células que expressam CLDN6, de preferência as células cancerosas, pode ser medida *in vitro* em um ensaio clonogênico. Um ensaio clonogênico é uma técnica de microbiologia para estudar a eficácia de agentes  
5 específicos na sobrevivência e proliferação das células. Ele é frequentemente utilizado em laboratórios de pesquisa do câncer para determinar o efeito dos fármacos ou radiação na proliferação de células tumorais. O experimento envolve três etapas principais: (i) aplicação de um tratamento a  
10 uma amostra de células, em particular células cancerosas, (ii) plaquear as células em um frasco de cultura de tecidos e (iii) permitir que as células cresçam. As colônias produzidas são fixadas, coradas e contadas. A formação de colônias é de importância no que diz respeito à formação de  
15 metástases se células tumorais individuais colonizam órgãos. A atividade inibidora dos anticorpos indica os seus potenciais na supressão da formação de metástases. Os anticorpos possuindo a atividade de inibição ou redução da formação de colônias em um ensaio clonogênico são  
20 particularmente úteis para tratar ou prevenir a metástase e o espalhamento metastático das células cancerosas, em particular dos tipos de câncer mencionados no presente documento.

Em modalidades preferidas, o anticorpo apresenta uma

ou mais funções efetoras imunes contra uma célula que  
carrega CLDN6 na sua conformação nativa, em que essas uma  
ou mais funções efetoras imunes são, de preferência,  
selecionadas do grupo consistindo de citotoxicidade  
5 dependente do complemento (CDC), citotoxicidade mediada por  
célula dependente de anticorpo (ADCC), indução de apoptose  
e inibição da proliferação; de preferência, as funções  
efetoras são ADCC e/ou CDC.

De preferência, as ditas uma ou mais atividades ou uma  
10 ou mais funções efetoras imunes exibidas pelo dito  
anticorpo são induzidas pela ligação do dito anticorpo à  
CLDN6, de preferência a um epítipo localizado dentro de uma  
porção extracelular de CLDN6, em que a dita porção  
extracelular de CLDN6 compreende de preferência a sequência  
15 de aminoácidos de qualquer uma de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO:  
7, SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15, de preferência a  
sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7,  
mais preferivelmente a sequência de aminoácidos da SEQ ID  
NO: 6.

20 De acordo com a invenção, uma célula que expressa  
CLDN6 é de preferência caracterizada por associação de  
CLDN6 com a sua superfície celular. Uma célula que expressa  
CLDN6 ou uma célula que carrega CLDN6 na sua conformação  
nativa é, de preferência, uma célula tumoral, tal como uma

célula cancerosa, de preferência uma célula cancerosa de um  
câncer selecionado do grupo consistindo de câncer de  
ovário, em particular adenocarcinoma ovariano e  
teratocarcinoma ovariano, câncer de pulmão, incluindo  
5 câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de  
pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular  
carcinoma de pulmão de célula escamosa e adenocarcinoma,  
câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de  
pâncreas, câncer de pele, em particular carcinoma de célula  
10 basal e carcinoma de célula escamosa, melanoma maligno,  
câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma  
pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma  
sinovial e carcinosarcoma, câncer do ducto biliar, câncer  
de bexiga, em especial carcinoma de célula de transição e  
15 carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma  
de célula renal incluindo carcinoma de célula renal de  
célula clara e carcinoma de célula renal papilar, câncer de  
cólon, câncer de intestino delgado, incluindo câncer de  
íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e  
20 adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular,  
coriocarcinoma da placenta, câncer cervical, câncer  
testicular, em particular seminoma testicular, teratoma  
testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino,  
um tumor de células germinativas, tal como um



teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular um tumor de célula germinativa do testículo, e as formas metastáticas do mesmo.

O anticorpo da invenção pode ser ligado a uma ou mais  
5 porções efetoras terapêuticas, por exemplo, radiomarcadores, citotoxinas, enzimas terapêuticas, agentes que induzem a apoptose e similares, a fim de proporcionar citotoxicidade direcionada, isto é, a morte das células tumorais.

10 Em uma modalidade, o anticorpo da invenção (i) se liga às células que expressam CLDN6, sendo caracterizado por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, e (ii) não se liga às células que não expressam CLDN6, não sendo caracterizado por associação de CLDN6 com as suas  
15 superfícies celulares. O anticorpo da invenção de preferência (i) medeia a morte e/ou inibe a proliferação das células que expressam CLDN6, sendo caracterizado por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, e (ii) não medeia a morte e/ou não inibem a proliferação de  
20 células que não expressam CLDN6, não sendo caracterizado por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares.

Em modalidades particulares preferidas, o anticorpo da invenção se liga aos epítomos nativos de CLDN6 presentes na superfície de células vivas, tais como aquelas das SEQ ID

Nos: 6 ou 7. Em outras modalidades preferidas, o anticorpo da invenção é específico para células cancerosas que expressam CLDN6 e não se liga às células cancerosas que não expressam CLDN6.

5 Os anticorpos da invenção podem ser derivados de espécies diferentes, incluindo, mas sem se limitar, a camundongo, rato, coelho, porquinho-da-índia e seres humanos. Os anticorpos da invenção também incluem moléculas quiméricas em que uma região constante de anticorpo  
10 derivada de uma espécie, de preferência seres humanos, é combinada com o sítio de ligação ao antígeno derivado de outras espécies. Além disso, os anticorpos da invenção incluem moléculas humanizadas em que os sítios de ligação ao antígeno de um anticorpo derivado de uma espécie não  
15 humana são combinados com regiões constantes e de estrutura de origem humana.

Os anticorpos da invenção incluem anticorpos policlonais e monoclonais e incluem anticorpos IgG2a (por exemplo, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG2b (por exemplo, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ),  
20 IgG3 (por exemplo, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) e IgM. No entanto, outros isotipos de anticorpos também são englobados pela invenção, incluindo os anticorpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Os anticorpos podem ser anticorpos inteiros ou

fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, incluindo, por exemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, fragmentos Fv de cadeia simples ou anticorpos biespecíficos. Além disso, os fragmentos de ligação a antígeno incluem proteínas de fusão de domínio de  
5 ligação à imunoglobulina, compreendendo (i) um domínio de ligação de polipeptídeo (tal como uma região variável de cadeia pesada ou uma região variável da cadeia leve) que é fundida com um polipeptídeo da região de dobradiça da imunoglobulina, (ii) uma região constante CH2 da cadeia  
10 pesada de imunoglobulina fundida à região de dobradiça, e (iii) uma região constante CH3 da cadeia pesada de imunoglobulina fundida com a região constante CH2. Tais proteínas de fusão de domínio de ligação à imunoglobulina são adicionalmente divulgadas em US 2003/0118592 e US  
15 2003/0133939.

O anticorpo da invenção de preferência é um anticorpo monoclonal, quimérico, humano ou humanizado, ou um fragmento de um anticorpo. Os anticorpos da invenção incluem anticorpos totalmente humanos. Tais anticorpos  
20 podem ser produzidos em um animal transgênico não humano, por exemplo, um camundongo transgênico, capaz de produzir isotipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para a CLDN6 submetendo-se a recombinação V-D-J e comutação de isotipo. Tal animal transgênico também pode ser um coelho

transgênico para a produção de anticorpos policlonais, tal como divulgado em US 2003/0017534.

Os anticorpos da presente invenção de preferência se dissociam de CLDN6 com uma constante de equilíbrio de  
5 dissociação (KD) de aproximadamente 1 a 100 nM ou menos. Preferivelmente, os anticorpos da invenção não reagem de forma cruzada com antígenos de superfície celular relacionados e, assim, não inibem a função destes.

Em modalidades preferidas, os anticorpos da presente  
10 invenção podem ser caracterizados por uma ou mais das seguintes propriedades:

- a) especificidade para CLDN6;
- b) afinidade de ligação para CLDN6 de cerca de 100 nM ou menos, de preferência, cerca de 5 a 10 nM ou menos e,  
15 mais preferivelmente, cerca de 1 a 3 nM ou menos,
- c) a capacidade de induzir CDC das células que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;
- d) a capacidade de inibir o crescimento de células que  
20 expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;
- e) a capacidade para induzir a apoptose de células que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;

f) A capacidade para induzir a adesão homotípica de células que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;

5 g) a capacidade de induzir ADCC de células que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares na presença de células efetoras;

10 h) a capacidade para prolongar a sobrevivência de um indivíduo tendo células tumorais que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;

i) a capacidade para destruir as células que expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares;

15 j) a capacidade de agregar CLDN6 na superfície de células vivas.

Um anticorpo preferido descrito no presente documento é um anticorpo produzido por ou obtível a partir de uma célula de hibridoma depositada no DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 20 38124 Braunschweig, Alemanha) e tendo uma das seguintes designações e números de acesso:

1. GT512muMAB 59A, número de acesso DSM ACC3067, depositado em 21 de junho de 2010;

2. GT512muMAB 60A, número de acesso DSM ACC3068,

depositado em 21 de junho de 2010;

3. GT512muMAB 61D, número de acesso DSM ACC3069,

depositado em 21 de junho de 2010;

4. GT512muMAB 64A, número de acesso DSM ACC3070,

5 depositado em 21 de junho de 2010;

5. GT512muMAB 65A, número de acesso DSM ACC3071,

depositado em 21 de junho de 2010;

6. GT512muMAB 66B, número de acesso DSM ACC3072,

depositado em 21 de junho de 2010;

10 7. GT512muMAB 67A, número de acesso DSM ACC3073,

depositado em 21 de junho de 2010;

8. GT512muMAB 55A, número de acesso DSM ACC3089,

depositado em 31 de agosto de 2010; ou

9. GT512muMAB 89A, número de acesso DSM ACC3090,

15 depositado em 31 de agosto de 2010.

Os anticorpos da invenção são designados aqui por referência à designação do anticorpo e/ou por referência ao clone produtor do anticorpo, por exemplo, muMAB 59A.

Outros anticorpos preferidos são aqueles que têm a  
20 especificidade dos anticorpos produzidos por e obteníveis a partir dos hibridomas acima descritos e, em particular, aqueles compreendendo uma porção de ligação ao antígeno ou sítio de ligação ao antígeno, em particular uma região variável, idêntica ou altamente homóloga àquela dos

anticorpos produzidos por e obteníveis a partir dos  
hibridomas acima descritos. É contemplado que os anticorpos  
preferidos são aqueles que têm regiões CDR idênticas ou  
altamente homólogas às regiões dos anticorpos produzidos  
5 por e obteníveis a partir dos hibridomas acima descritos.  
Por "altamente homólogo" é contemplado que de 1 a 5, de  
preferência de 1 a 4, tal como de 1 a 3 ou 1 ou 2  
substituições podem ser feitas em cada região CDR. Os  
anticorpos particularmente preferidos são as formas  
10 quimerizadas e humanizadas dos anticorpos produzidos por e  
obteníveis a partir dos hibridomas acima descritos.

Deste modo, um anticorpo da invenção pode ser  
selecionado do grupo que consiste de (i) um anticorpo  
produzido por ou obténível a partir de um clone depositado  
15 sob o número de acesso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM  
ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM  
ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM  
ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM  
ACC3089 (GT512muMAB 55A) ou DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A),  
20 (ii) um anticorpo que é uma forma quimerizada ou humanizada  
do anticorpo designado em (i), (iii) um anticorpo que tem a  
especificidade do anticorpo designado em (i) e (iv) um  
anticorpo que compreende a porção de ligação ao antígeno ou  
sítio de ligação a antígeno do anticorpo designado em (i).

A porção de ligação ao antígeno ou sítio de ligação ao antígeno do anticorpo designado em (i) pode compreender a região variável do anticorpo designado em (i).

A presente invenção também se refere a uma célula, tal  
5 como uma célula de hibridoma que produz um anticorpo como descrito no presente documento.

Células de hibridoma preferidas são aquelas depositadas no DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemanha) e com uma das seguintes designações e números de  
10 acesso:

1. GT512muMAB 59A, número de acesso DSM ACC3067,  
depositada em 21 de junho de 2010;

2. GT512muMAB 60A, número de acesso DSM ACC3068,  
depositada em 21 de junho de 2010;

15 3. GT512muMAB 61D, número de acesso DSM ACC3069,  
depositada em 21 de junho de 2010;

4. GT512muMAB 64A, número de acesso DSM ACC3070,  
depositada em 21 de junho de 2010;

20 5. GT512muMAB 65A, número de acesso DSM ACC3071,  
depositada em 21 de junho de 2010;

6. GT512muMAB 66B, número de acesso DSM ACC3072,  
depositada em 21 de junho de 2010;

7. GT512muMAB 67A, número de acesso DSM ACC3073,  
depositada em 21 de junho de 2010;



8. GT512muMAB 55A, número de acesso DSM ACC3089, depositada em 31 de agosto de 2010; ou

9. GT512muMAB 89A, número de acesso DSM ACC3090, depositada em 31 de agosto de 2010.

5 Os anticorpos anti-CLDN6 da presente invenção podem ser derivatizados, ligados a ou coexpressos com outras especificidades de ligação. Em uma modalidade particular, a invenção fornece uma molécula biespecífica ou multiespecífica compreendendo pelo menos uma primeira  
10 especificidade de ligação para CLDN6 (por exemplo, um anticorpo anti-CLDN6 ou um mimético do mesmo), e uma segunda especificidade de ligação para uma célula efetora, tal como uma especificidade de ligação para um receptor Fc (por exemplo, um receptor Fc-gama, tal como Fc-gama RI, ou  
15 qualquer outro receptor Fc) ou um receptor de células T, por exemplo, CD3.

Deste modo, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas que se ligam tanto à CLDN6 e a um receptor Fc ou a um receptor de células T, por  
20 exemplo, CD3. Exemplos de receptores Fc são o receptor de IgG, o receptor Fc-gama (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16). Outros receptores Fc, como os receptores de IgA (por exemplo, FcαRI), também podem

ser alvejados. O receptor Fc está preferencialmente localizado na superfície de uma célula efetora, por exemplo, um monócito, macrófago ou uma célula mononuclear ativada. Em uma modalidade preferida, as moléculas  
5 biespecíficas e multiespecíficas se ligam a um receptor Fc em um sítio que é distinto do sítio de ligação Fc de imunoglobulina (por exemplo, IgG ou IgA) do receptor. Portanto, a ligação das moléculas biespecíficas e multiespecíficas não é bloqueada pelos níveis fisiológicos  
10 das imunoglobulinas.

Em ainda outro aspecto, os anticorpos anti-CLDN6 da invenção são derivatizados, ligados a ou coexpressos com outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína (por exemplo, um fragmento Fab'). Por exemplo, um  
15 anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou outra forma) a um ou mais outras entidades moleculares, tal como outro anticorpo (por exemplo, para produzir um anticorpo biespecífico ou  
20 multiespecífico), uma citotoxina, ligante celular ou antígeno (por exemplo, para produzir um imunoc conjugado, tal como uma imunotoxina). Um anticorpo da presente invenção pode ser ligado a outras porções terapêuticas, por exemplo, um radioisótopo, um fármaco anticâncer de molécula pequena,

uma citocina ou quimiocina recombinante. Deste modo, a presente invenção engloba uma grande variedade de conjugados de anticorpos, moléculas biespecíficas e multiespecíficas e proteínas de fusão, todas as quais se ligando às células que expressam CLDN6 e/ou às células sendo caracterizadas por associação da CLDN6 com as suas superfícies celulares e que podem ser usadas para alvejar outras moléculas a tais células.

Geralmente, para os fins da presente invenção, todos os derivados de anticorpos, tais como conjugados de anticorpos, moléculas biespecíficas e multiespecíficas e proteínas de fusão aqui descritas são englobados pelo termo "anticorpo".

Em outro aspecto, a invenção também prevê proteínas de ligação à CLDN6 derivadas de domínios que não são imunoglobulinas, em particular proteínas de cadeia única. Tais proteínas de ligação e os métodos para a produção destas estão descritos, por exemplo, em Binz e col. (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268, aqui incorporado por referência. É para ser entendido que o ensinamento dado no presente documento com relação às moléculas de ligação derivadas de imunoglobulina ou à imunoglobulina também se aplica correspondentemente às moléculas de ligação derivadas de domínios não- imunoglobulina. Em particular,

utilizando tais moléculas de ligação derivadas de domínios não-imunoglobulina é possível bloquear CLDN6 de células que expressam o dito alvo e que são caracterizadas por associação do dito alvo com as suas superfícies celulares e, assim, para produzir efeitos terapêuticos tais como aqui descritos para os anticorpos da invenção, em particular, a inibição de uma ou mais atividades de células tumorais como aqui divulgado, tal como a proliferação. Embora não seja obrigatório, é possível conferir funções efetoras dos anticorpos para tais moléculas de ligação não-imunoglobulina através de, por exemplo, fusão com a região Fc de anticorpos.

A presente invenção geralmente engloba o tratamento e/ou o diagnóstico de doenças, em particular doenças tumorais, por alveijamento de CLDN6 expressa pelas células e sendo associada com a superfície das células. Estes métodos proporcionam a detecção e/ou erradicação seletiva de tais células, minimizando assim os efeitos adversos para as células normais que não expressam CLDN6 e não sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares. Doenças preferidas para uma terapia ou diagnóstico são aquelas em que as células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares estão envolvidas, tal como as

doenças tumorais, em particular as doenças de câncer, tais como aquelas descritas aqui.

Em um aspecto, a invenção fornece composições, por exemplo, composições/kits farmacêuticos e de diagnóstico, compreendendo um anticorpo ou uma combinação de anticorpos da invenção. Uma composição farmacêutica da invenção pode compreender um veículo farmaceuticamente aceitável e pode opcionalmente compreender um ou mais adjuvantes, estabilizantes, etc. Em uma modalidade particular, a composição inclui uma combinação de anticorpos que se ligam a epítomos diferentes ou que possuem características funcionais distintas, tais como indução de CDC e/ou ADCC e indução de apoptose. Nesta modalidade da invenção, os anticorpos podem ser utilizados em combinação, por exemplo, como uma composição farmacêutica compreendendo dois ou mais anticorpos monoclonais anti-CLDN6. Por exemplo, anticorpos anti-CLDN6 possuindo atividades diferentes, porém complementares, podem ser combinados em uma única terapia para alcançar um efeito terapêutico desejado. Em uma modalidade preferida, a composição inclui um anticorpo anti-CLDN6 que medeia CDC combinado com outro anticorpo anti-CLDN6 que induz a apoptose. Em outra modalidade, a composição inclui um anticorpo anti-CLDN6 que medeia a morte altamente eficaz de células alvo na presença de

células efetoras, combinado com outro anticorpo anti-CLDN6 que inibe o crescimento de células expressando CLDN6 e sendo caracterizado por associação de CLDN6 com suas superfícies celulares.

5 A presente invenção também inclui a administração simultânea ou sequencial de dois ou mais anticorpos anti-CLDN6 da invenção, em que de preferência pelo menos um dos ditos anticorpos é um anticorpo anti-CLDN6 quimérico e pelo menos um anticorpo adicional é um anticorpo anti-CLDN6 humano, os anticorpos que se ligando a epítomos iguais ou  
10 diferentes de CLDN6. De preferência, um anticorpo CLDN6 quimérico da invenção é administrado primeiro seguido pela administração de um anticorpo anti-CLDN6 humano da invenção, em que o anticorpo anti-CLDN6 humano é  
15 administrado preferivelmente por um período prolongado de tempo, isto é, como terapia de manutenção.

Os anticorpos, conjugados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas e composições da presente invenção podem ser utilizados em uma variedade de métodos  
20 para inibir o crescimento de células que expressam CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares e/ou matando seletivamente as células que expressam CLDN6 e são caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares por contato das

células com uma quantidade eficaz do anticorpo, conjugado, molécula ou composição biespecífica/multiespecífica, de tal modo que o crescimento da célula é inibido e/ou a célula é morta. Em uma modalidade, o método inclui matar a célula que expressa CLDN6 e é caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular, opcionalmente na presença de células efectoras, por exemplo, através de CDC, apoptose, ADCC, fagocitose ou por uma combinação de dois ou mais destes mecanismos. Células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, que podem ser inibidas ou mortas usando os anticorpos da invenção, incluem células cancerosas.

Anticorpos, conjugados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas e composições da presente invenção podem ser usadas para tratar e/ou prevenir uma variedade de doenças que envolvem as células que expressam CLDN6 e são caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares através da administração dos anticorpos aos pacientes que sofrem de tais doenças. Exemplos de doenças que podem ser tratadas (por exemplo, melhoradas) ou evitadas incluem, mas não estão limitadas, a doenças tumorais. Exemplos de doenças tumorais, que podem ser tratadas e/ou evitadas, incluem doenças cancerígenas,

tais como câncer do ovário, em particular adenocarcinoma de ovário e teratocarcinoma de ovário, câncer de pulmão, incluindo câncer do pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular carcinoma pulmonar de células escamosas e adenocarcinoma, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, em particular o carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, em especial o carcinoma de células de transição e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de células renais incluindo o carcinoma de células renais de células claras e carcinoma de célula renal papilar, câncer de cólon, câncer de intestino delgado, incluindo câncer do íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma de placenta, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, um tumor de célula germinativa, tal como um teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular um tumor de célula germinativa



do testículo, e as formas metastáticas dos mesmos.

Em outro aspecto, a invenção se refere a um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio envolvendo células que expressam CLDN6 e que são

5 caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, compreendendo a administração do anticorpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica ou composição da invenção a um indivíduo. De preferência, a doença ou distúrbio é uma doença relacionada ao tumor e, em

10 modalidades particulares, ela é selecionada do grupo consistindo de câncer do ovário, em particular de adenocarcinoma do ovário e teratocarcinoma do ovário, câncer de pulmão, incluindo o câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas

15 (NSCLC), em particular carcinoma pulmonar de células escamosas e adenocarcinoma, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer de pâncreas, câncer de pele, em particular carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, câncer de cabeça e

20 pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, em particular o carcinoma de células de transição e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de célula renal

incluindo o carcinoma de célula renal de células claras e carcinoma de célula renal papilar, câncer de cólon, câncer de intestino delgado, incluindo o câncer do íleo, em particular o adenocarcinoma do intestino delgado e  
5 adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma de placenta, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer do útero, um tumor de células germinativas, tal como um  
10 teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular um tumor de célula germinativa do testículo, e as formas metastáticas dos mesmos. CLDN6 é de preferência expressa na superfície das ditas células.

A invenção pode envolver a utilização dos agentes e  
15 composições aqui descritos para um tratamento profilático e/ou terapêutico de doenças tumorais, isto é, para o tratamento de um paciente com uma doença tumoral, ou estando em risco de desenvolver uma doença tumoral. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para inibir o  
20 crescimento tumoral compreendendo a administração de um ou mais dos agentes e composições aqui descritos.

De preferência, os agentes e composições descritos no presente documento são administrados de uma maneira tal que a substância terapeuticamente ativa não é distribuída ou

não é substancialmente distribuída a um tecido ou órgão, em que as células, enquanto o tecido ou órgão está isento de tumores, expressam CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, tal como tecido de placenta ou placenta. Para este fim, os  
5 agentes e composições aqui descritos podem ser administrados localmente.

Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo como aqui descrito para utilização nos métodos de tratamento  
10 descritos no presente documento. Em uma modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica tal como aqui descrita para utilização nos métodos de tratamento aqui descritos.

Em uma modalidade particular da invenção, o indivíduo  
15 sendo administrado com o anticorpo é adicionalmente tratado com um agente quimioterápico, radiação ou um agente que modula, por exemplo, estimula ou inibe, a expressão ou atividade de um receptor Fc, por exemplo, um receptor Fc-gama, tal como uma citocina. Citocinas típicas para  
20 administração durante o tratamento incluem fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). Agentes terapêuticos típicos incluem, entre outros,

agentes antineoplásicos, tais como doxorubicina, cisplatina, taxotere, 5-fluoruracil, metotrexato, gemcitabina e ciclofosfamida.

Em ainda outro aspecto, a invenção se refere a uma  
5 estratégia de imunização para imunizar animais não humanos, tais como camundongos, com CLDN6 humano ou um fragmento peptídico do mesmo para obter anticorpos. Peptídeos preferidos para a imunização são aqueles selecionados do grupo consistindo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:  
10 14 e SEQ ID NO: 15, e os peptídeos imunologicamente equivalentes.

Animais não humanos de tipo selvagem bem como transgênicos podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno CLDN6 ou um fragmento  
15 de peptídeo do mesmo e/ou ácidos nucleicos e/ou células que expressam CLDN6 ou um fragmento peptídico das mesmas. De preferência, o animal não humano transgênico é capaz de produzir isotipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CLDN6 (por exemplo, IgG, IgA e/ou IgM)  
20 submetendo-se à recombinação V-D-J e comutação de isotipo. A comutação de isotipo pode ocorrer através de, por exemplo, comutação de isotipo clássica ou não clássica.

Assim, em ainda outro aspecto, a invenção fornece células B isoladas de um animal não humano, como descrito

acima. As células B isoladas podem então ser imortalizadas por fusão para uma célula imortalizada para fornecer uma fonte (por exemplo, um hibridoma) de anticorpos da invenção. Tais hibridomas (isto é, que produzem anticorpos da invenção) são também incluídos no escopo da invenção.

Em um aspecto adicional, a presente invenção diz respeito aos métodos para diagnóstico, detecção ou monitoramento de uma doença tumoral compreendendo a detecção e/ou determinação da quantidade de CLDN6 ou células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares em uma amostra biológica isolada de um paciente utilizando um anticorpo da invenção. A amostra biológica pode ser isolada de um paciente com uma doença tumoral, sendo suspeito de ter ou adoecer com uma doença tumoral ou tendo um potencial para uma doença tumoral.

Em uma modalidade do método para diagnóstico, a detecção ou monitoramento de uma doença tumoral de acordo com a invenção, uma amostra biológica e/ou uma amostra de controle/referência é de um tecido ou órgão correspondendo ao tecido ou órgão que é será diagnosticado, detectado ou monitorado em relação ao afetado por uma doença tumoral, por exemplo, a doença tumoral que é para ser diagnosticada, detectada ou monitorada é câncer de ovário e a amostra

biológica e/ou amostra de controle/referência é o tecido do ovário. Tais tecidos e órgãos são aqui descritos, por exemplo, juntamente com doenças tumorais e cânceres diferentes.

5        Em uma modalidade dos métodos de diagnóstico, detecção monitoramento de uma doença tumoral, a amostra biológica é de um tecido ou órgão, em que as células, quando o tecido ou órgão está isento de tumores, não expressam substancialmente CLDN6 e não são caracterizadas por  
10        associação substancial de CLDN6 com as suas superfícies celulares. Preferivelmente, o dito tecido é um tecido diferente do tecido da placenta.

      Tipicamente, o nível de uma molécula alvo em uma amostra biológica é comparado com um nível de referência,  
15        em que um desvio do dito nível de referência é indicativo da presença e/ou estágio de uma doença tumoral em um indivíduo. O nível de referência pode ser um nível tal como determinado em uma amostra de controle (por exemplo, de um tecido ou indivíduo saudável) ou um nível mediano de  
20        indivíduos saudáveis. Um "desvio" do dito nível de referência designa qualquer alteração significativa, tal como um aumento ou diminuição de pelo menos 10%, 20% ou 30%, de preferência de pelo menos 40% ou 50%, ou mesmo mais. De preferência, a presença de CLDN6 ou células

expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares na dita amostra biológica ou uma quantidade de CLDN6 ou células que expressam CLDN6 e sejam caracterizadas por associação de  
5 CLDN6 com as suas superfícies celulares na amostra biológica que está aumentada em comparação com um nível de referência indica a presença de uma doença tumoral.

Tipicamente, a detecção e/ou determinação da quantidade nos métodos da invenção envolve a utilização de  
10 anticorpos marcados que se ligam especificamente a uma molécula alvo.

Em um aspecto particular, a invenção se refere a um método para a detecção, isto é, a determinação da posição ou sítio de uma doença tumoral, por exemplo, um tecido ou  
15 órgão particular, que compreende administrar um anticorpo da presente invenção que está acoplado a um marcador detectável a um paciente. A marcação de um tecido ou órgão no dito paciente pode indicar a presença de, ou risco de uma doença tumoral no dito tecido ou órgão.

20 Como aqui exemplificado, os anticorpos da invenção podem ser obtidos diretamente a partir de hibridomas que expressam o anticorpo, ou podem ser clonados e expressos de forma recombinante em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula CHO, ou uma célula linfocítica). Outros exemplos

de células hospedeiras são microrganismos, tais como *E. coli*, e fungos, tais como leveduras. Alternativamente, eles podem ser produzidos de forma recombinante em um animal não humano ou vegetal transgênicos. No entanto, a presente  
5 invenção também prevê modalidades em que os anticorpos são produzidos por imunização ou vacinação utilizando estratégias de imunização, como aqui divulgado *in situ* em um paciente.

A presente invenção também se refere aos ácidos  
10 nucleicos que compreendem genes ou sequências de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos ou partes destes, por exemplo, uma cadeia de anticorpo, como descrito no presente documento. Os ácidos nucleicos podem estar compreendidos em um vetor, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo, vírus,  
15 bacteriófago ou outro vetor utilizado convencionalmente, por exemplo, em engenharia genética. O vetor pode compreender genes adicionais, tais como genes marcadores que permitem a seleção do vetor em uma célula hospedeira adequada e sob condições adequadas. Além disso, o vetor  
20 pode compreender elementos de controle de expressão que permitem a expressão adequada das regiões de codificação em hospedeiros adequados. Tais elementos de controle são conhecidos para o técnico e podem incluir um promotor, um cassete de união e um códon de iniciação da tradução.



De preferência, o ácido nucleico da invenção está operativamente ligado às sequências de controle de expressão acima, que permitem a expressão em células eucarióticas ou procarióticas. Elementos de controle que asseguram a expressão em células eucarióticas ou procarióticas são bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

Métodos para a construção de moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, para a construção de vetores compreendendo as moléculas de ácido nucleico acima, para introdução dos vetores em células hospedeiras apropriadamente escolhidas, para causar ou alcançar a expressão são bem conhecidos na técnica.

Um aspecto adicional da presente invenção se refere a uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico ou vetor, tal como divulgado no presente documento.

Outras características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

## **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

**Figura 1. Alinhamento da sequência de CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9.**

**Figura 2. Análise por imunofluorescência de soros obtidos de camundongos imunizados para produzir anticorpos**

**específicos para CLDN6.**

(A) Células CHO-K1 não fixadas cotransfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN6 humana e GFP, respectivamente, foram sondadas com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-CLDN6 (R&D Systems, MAB3656). CLDN6 está localizada na membrana plasmática das células transfectadas e pode ser alvejada em células vivas por anticorpos específicos.

(B) Soro de um camundongo, com base no qual o hibridoma F3-6C3-H8 que foi produzido continha anticorpos que se ligam à CLDN6 na superfície de células CHO-K1 não fixadas cotransfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN6 e GFP humanas.

**Figura 3. Análise de Western blot para avaliar a expressão endógena de proteínas claudina em células HEK293T.**

Lisados de proteínas das células HEK293T transfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9, respectivamente, ou transfectados de forma simulada foram testados por Western blotting utilizando anticorpos comercialmente disponíveis anti-CLDN3(A) (Invitrogen, No. Cat. 34-1700), anti-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), anti-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) e anti-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672). Os anticorpos detectaram a expressão dos seus alvos

correspondentes apenas nos respectivos transfectantes HEK293T. Nenhuma expressão endógena de qualquer uma destas claudinas foi observada em células HEK293T não transfectadas.

5       **Figura 4. Análise de citometria de fluxo para avaliar a especificidade dos anticorpos anti-CLDN comercialmente disponíveis.**

A ligação de anticorpos anti-CLDN comercialmente disponíveis a células HEK293T transfectadas com ácidos  
10       nucleicos que codificam CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9, respectivamente, ou não transfectadas foi determinada por citometria de fluxo. Apenas o anticorpo anti-CLDN3 comercialmente disponível é específico para o seu alvo.

15       **Figura 5. Análise de citometria de fluxo para avaliar a especificidade dos anticorpos anti-CLDN preparados de acordo com a invenção.**

A ligação de anticorpos em sobrenadantes de subclones de hibridomas monoclonais às células HEK293T  
cotransfectadas com um vetor que codifica CLDN6, CLDN3,  
20       CLDN4 ou CLDN9 e um vetor que codifica um marcador de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo.

(A) Anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 se ligam especificamente às células transfectadas com CLDN6, mas não às células

transfectadas com CLDN3, CLDN4 e CLDN9, respectivamente. Ao contrário, os anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F4-4F7-F2 se ligam às células transfectadas com CLDN6 ou CLDN9. Anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 também se ligam às células transfectadas com a variante (I143V)-SNP de CLDN6.

(B) Anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-7B3-B4 se ligam às células transfectadas com CLDN6, CLDN3 ou CLDN9. Anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-3F7-A5 se ligam às células transfectadas com CLDN6, CLDN4 ou CLDN9.

**Figura 6. Especificidade de ligação de anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A.**

A ligação dos anticorpos anti-CLDN6 às CLDN6, 3, 4, 9 humanas e à variante I143V CLDN6 SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) foi analisada por citometria de fluxo utilizando células HEK293T expressando transitoriamente a claudina humana correspondente. HEK293T foram cotransfectadas com um marcador de fluorescência para distinguir entre células não transfectadas (população Q1 e Q3) e transfectadas (população Q2 e Q4). A concentração de

anticorpos utilizada foi a concentração que saturou a ligação à CLDN6 (25 µg/ml). A expressão das CLDN6, 3, 4, 9 humanas e CLDN6-SNP(I143V) foi confirmada com anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis contra a claudina 6 humana (R&D Systems, MAB3656), Claudina 3 humana (R&D Systems, MAB4620) e a Claudina 4 humana (R&D Systems, MAB4219).

**Figura 7. Afinidades relativas de anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A.**

Para determinar as afinidades relativas, a ligação dos anticorpos anti-CLDN6 à CLDN6 humana expressa de forma estável na superfície de células HEK293 foi analisada por citometria de fluxo. No experimento de saturação de ligação, a concentração dos anticorpos foi representada graficamente contra os sinais FACS (mediana da intensidade de fluorescência). A EC50 (concentração de anticorpo que se liga à metade dos sítios de ligação no equilíbrio) foi calculada por regressão não linear. Os anticorpos CLDN6 específicos muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A exibiram valores de EC50 muito baixos (EC50 de 200-500 ng/ml) e a saturação da ligação foi alcançada em baixas concentrações.

**Figura 8. Atividade da citotoxicidade dependente do**

complemento (CDC) de anticorpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A.

A atividade CDC de anticorpos anti-CLDN6 foi analisada utilizando um ensaio dependente de luciferase para detectar ATP endógeno dentro de células não lisadas. Portanto, células CHO-K1 expressando de forma estável a CLDN6 humana foram tratadas com diferentes concentrações de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A. MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A exibiram atividade CDC dose-dependente e induziram CDC em baixas concentrações.

**Figura 9. Atividade da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) de anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 65A e 66B em células NEC8 e NEC8 LVTS2 54 (expressão reduzida de CLDN6) expressando CLDN6 endogenamente.**

Os anticorpos anti-CLDN6 muMAB 65A e 66B induziram CDC em células NEC8 de uma maneira dose-dependente. A especificidade de alvo de muMAB 65A e 66B foi provada pelo uso de células NEC8 LVTS2 54 (expressão reduzida de CLDN6).

**Figura 10. Efeito terapêutico de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A em um modelo de xenoenxerto de tratamento inicial usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.**

O modelo usou xenoenxertos NEC8 expressando

endogenamente CLDN6 em camundongo *Nude-Foxn1<sup>nu</sup>* atímicos. Comparado ao grupo de controle de salina, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A mostraram inibição do crescimento tumoral em camundongos enxertados com células NEC8.

5       **Figura 11. Especificidade de ligação de anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A.**

A ligação dos anticorpos anti-CLDN6 à CLDN6, 3, 4 e 9 humanas, respectivamente, foi analisada por citometria de  
10 fluxo utilizando células HEK293 expressando estavelmente a claudina humana correspondente. A concentração de anticorpo utilizada foi a concentração que saturou a ligação (25 µg/mL). A expressão de CLDN3, 4, 6 e 9 humanas foi confirmada com anticorpos monoclonais comercialmente  
15 disponíveis contra Claudina-3 humana (R&D Systems, MAB4620), Claudina-4 humana (R&D Systems, MAB 4219) e o anticorpo monoclonal murino CLDN6/9-reativo muMAB 5F2D2, respectivamente. O controle negativo foi realizado sob condições idênticas, sem o anticorpo primário.

20       **Figura 12. Afinidades relativas de anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chim AB 61D, 64A, 67A e 89A às células HEK293-CLDN6.**

Para determinar as afinidades relativas, a ligação de anticorpos anti-CLDN6 à CLDN6 humana expressa de forma

estável na superfície de células HEK293 foi analisada por citometria de fluxo. No experimento de saturação de ligação, a concentração dos anticorpos foi representada graficamente contra os sinais FACS (mediana da intensidade de fluorescência). A EC50 (concentração de anticorpo que se liga a metade dos sítios de ligação em equilíbrio) foi calculada por regressão não linear. Os anticorpos específicos para CLDN6 chimAB 64A e 89A exibiram valores de EC50 muito baixos (EC50 de 450 a 600 ng/mL) e a saturação da ligação foi alcançada em baixas concentrações. ChimAB 67A e 61D apresentaram valores baixos (EC50 de 1000 ng/ml) e médios (EC50 de 2300 ng/ml), respectivamente.

**Figura 13. Afinidades relativas de anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A às células NEC8.**

Para determinar as afinidades de ligação de anticorpos anti-CLDN6 às células tumorais que expressam endogenamente CLDN6 humana, a ligação à linhagem celular de câncer testicular NEC8 foi analisada por citometria de fluxo. Os anticorpos CLDN6 específicos chimAB 64A e 89A exibiram valores de EC50 muito baixos (EC50 600-650 ng/ml) e a saturação da ligação foi alcançada em concentrações baixas, enquanto que chimAB 61D e 67A apresentaram valores de EC50 médio (EC50 de 1700 ng/ml) e elevado (EC50 de 6100 ng/ml),



respectivamente.

**Figura 14. Afinidades relativas de anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A às células OV90.**

5 Para determinar as afinidades de ligação de anticorpos anti-CLDN6 às células tumorais que expressam endogenamente CLDN6 humana, a ligação à linhagem celular de câncer de ovário OV90 foi analisada por citometria de fluxo. Os anticorpos CLDN6 específicos chimAB 64A e 89A exibiram  
10 valores de EC50 muito baixos (EC50 de 550 a 600 ng/ml) e a saturação da ligação foi alcançada em baixas concentrações. ChimAB 61D e 67A apresentaram valores de EC50 médios (EC50 de 1500 ng/ml e EC50 de 2300 ng/ml, respectivamente).

**Figura 15. Atividade da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) de anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A em células NEC8 com expressão reduzida e células NEC8 tipo selvagem.**

A atividade CDC de anticorpos anti-CLDN6 foi analisada utilizando um ensaio dependente de luciferase para detectar  
20 ATP endógeno no interior de células não lisadas. Portanto, as células NEC8 tipo selvagem (NEC8 LVTS2 77) expressando ectopicamente a luciferase foram tratadas com diferentes concentrações de chimAB 61D, 64A, 67A e 89A. As células NEC-8 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A apresentaram atividade CDC

de maneira dose-dependente, enquanto que nas células NEC-8 com redução da expressão de CLDN6 (NEC8 LVTS2 54) nenhum destes anticorpos induziu a lise celular inespecífica. Este resultado demonstrou as funções efetoras alvo específicas de chimAB 61D, 64A, 67A e 89A.

**Figura 16. Atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) dos anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A em células NEC8 com redução da expressão e NEC8 tipo selvagem.**

A atividade ADCC dos anticorpos anti-CLDN6 foi analisada utilizando um ensaio dependente de luciferase para detectar ATP endógeno no interior das células não lisadas. Portanto, as células NEC-8 tipo selvagem (NEC8 LVTS2 77) foram tratadas com diferentes concentrações de chimAB 61D, 64A, 67A e 89A. ChimAB 61D, 64A, 67A e 89A exibiram atividade ADCC dose-dependente e induziram ADCC mesmo em baixas concentrações de anticorpo. Para demonstrar a especificidade alvo, células NEC8 com uma redução da expressão de CLDN6 estável (NEC8 LVTS2 54) foram usadas.

**Figura 17. Efeito terapêutico de longo prazo de anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 64A e 67A em um modelo de xenoenxerto de tratamento inicial usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.**

O modelo usou xenoenxertos de NEC8 expressando CLDN6 endogenamente em camundongos Nude-Foxn1<sup>nu</sup> atímicos. Os camundongos foram tratados durante 46 dias com anticorpos específicos para CLDN6. Após o tratamento, o crescimento tumoral foi monitorado durante 60 dias. Mesmo após a interrupção da imunoterapia, os camundongos tratados com anticorpos monoclonais murinos muMAB 61D, 64A e 67A não apresentaram qualquer crescimento tumoral.

**Figura 18. Efeito terapêutico dos anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 89A em um modelo de xenoenxerto de tratamento inicial usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.**

O modelo usou xenoenxertos de NEC8 expressando CLDN6 endogenamente em camundongos Nude-Foxn1<sup>nu</sup> atímicos. Manchas de dispersão representam os volumes de tumores enxertados em diferentes intervalos durante o tratamento inicial de xenoenxertos NEC8 em camundongos Nude-Foxn1<sup>nu</sup> atímicos. Comparado com o grupo de controle de salina, muMAB 89A apresentou inibição do crescimento tumoral em camundongos enxertados com células NEC8(A). Os camundongos foram tratados durante 47 dias com PBS como controle e o anticorpo específico para CLDN6, respectivamente. O crescimento tumoral foi monitorado durante mais 51 dias. Em comparação com o controle de PBS, não houve tumores

detectáveis em camundongos tratados com muMAB89A no final do estudo (B).

**Figura 19. Efeito terapêutico do anticorpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.**

Manchas de dispersão representam os volumes dos tumores enxertados em diferentes intervalos durante o tratamento de xenoenxerto NEC8 avançado em camundongos Nude-Foxn1<sup>nu</sup> atímicos. A imunoterapia com o anticorpo anti-CLDN6 monoclonal murino muMAB 64A apresentou uma inibição do crescimento tumoral de xenoenxertos sólidos de NEC8 em comparação tanto com o anticorpo quanto com os grupos de controle de salina.

**Figura 20. Efeito terapêutico em longo prazo do anticorpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.**

15 dias após o enxerto, os camundongos foram tratados durante 45 dias com o anticorpo muMAB 64A específico para CLDN6. O crescimento tumoral foi monitorado durante mais 49 dias (A). O gráfico de sobrevida mostrou sobrevida prolongada dos camundongos tratados com o anticorpo muMAB

64A específico para CLDN6 (B).

Figura 21. Efeito terapêutico de anticorpos monoclonais de murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A e 89A, em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.

Manchas de dispersão representam os volumes de tumores NEC8 enxertados em diferentes intervalos durante o tratamento de xenoenxertos NEC8 avançados. Em comparação com os grupos de salina e controle de anticorpo, a inibição do crescimento tumoral foi alcançada com os anticorpos anti-CLDN6 monoclonais murinos muMAB 61D, 67A e 89A.

Figura 22. Efeito terapêutico de longo prazo de anticorpos monoclonais de murino anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A e 89A em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8.

17 dias após o enxerto, os camundongos foram tratados durante 42 dias com os anticorpos específicos para CLDN6 muMAB 61D, 67A e 89A. O crescimento tumoral foi monitorado durante mais 49 dias (A). O gráfico de sobrevida mostrou sobrevida prolongada dos camundongos tratados com os anticorpos específicos para CLDN6 muMAB 61D e 67A (B).

Figura 23. Efeito terapêutico de anticorpos

monoclonais de murino anti-CLDN6 muMAB 64A e 89A em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado utilizando camundongos enxertados com células NEC8 tipo selvagem e NEC8 com uma redução estável da expressão de CLDN6.

5 MuMAB 64A e 89A apresentaram efeito terapêutico apenas em camundongos enxertados com NEC8 tipo selvagem, mas não em camundongos enxertados com células NEC8 com redução da expressão de CLDN6, demonstrando a especificidade alvo dos anticorpos *in vivo*.

10 **Figura 24. Mapeamento de epítipo de alta resolução de chimMAB 61D, 64A, 67A e 89A.**

Os mutantes de alanina são denominados como "alanina de número de resíduo tipo selvagem" ou "glicina de número de resíduo tipo selvagem", no caso de alanina tipo selvagem, onde os aminoácidos são fornecidos no código de letra única. Os aminoácidos F35, G37, S39 e, possivelmente, T33 do primeiro domínio extracelular de CLDN6 são importantes para a interação com os anticorpos quiméricos específicos para CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A. O resíduo I40 é essencial para a ligação de chimAB 89A e 20 contribui para a ligação de chimAB 61D e 67A. Além disso, L151 do segundo domínio extracelular de CLDN6 contribui para a interação com chimAB 67A. Embora experimentos de imunofluorescência tenham confirmado a expressão de

mutantes de CLDN6 P28A, W30A, G49A, L50A, W51A, C54A e C64A, eles não apresentaram coloração de membrana. Por este motivo, não podemos excluir a interação de nossos anticorpos com esses aminoácidos. No total, o epítipo como  
5 identificado no presente documento é consistente com a nossa estratégia de imunização usando DNA e peptídeos do domínio EC1 de CLDN6.

**Figura 25. Alinhamento de sequências de aminoácidos da região variável de cadeia pesada de anticorpos específicos para CLDN6 da invenção.**  
10

As sequências de CDR (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) estão destacadas por uma caixa.

**Figura 26. Alinhamento das sequências de aminoácidos da região variável de cadeia leve de anticorpos específico para CLDN6 da invenção.**  
15

As sequências de CDR (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) estão destacadas por uma caixa.

#### **DEFINIÇÃO DE TERMOS**

A fim de que a presente invenção possa ser mais  
20 prontamente compreendida, certos termos são definidos primeiro. Definições adicionais são estabelecidas ao longo de toda a descrição detalhada.

Ao longo deste relatório descritivo e das reivindicações que se seguem, a menos que o contexto exija

o contrário, a palavra "compreender" e variações como "compreende" e "compreendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de um membro estabelecido, número inteiro ou etapa ou grupo de membros, números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro membro, número inteiro ou etapa ou grupo de membros, números inteiros ou etapas. Os termos "um" e "uma" e "o/a" e referências semelhantes utilizadas no contexto de descrição da invenção (especialmente no contexto das reivindicações) devem ser interpretados para abranger tanto o singular quanto o plural, a menos que seja aqui indicado de outra forma ou seja claramente contradito pelo contexto. A citação de faixas de valores aqui é meramente tencionada a servir como um método abreviado de referir-se individualmente a cada valor separado estando dentro da faixa. Salvo indicação em contrário no presente documento, cada valor individual é incorporado no relatório descritivo como se fosse individualmente citado aqui. Todos os métodos aqui descritos podem ser realizados em qualquer ordem apropriada, a menos que seja indicado de outra forma aqui, ou, de outra forma, claramente contradito pelo contexto. A utilização de qualquer um e todos os exemplos, ou linguagem exemplificadora (por exemplo, "tal como") aqui fornecida destina-se meramente a ilustrar melhor a invenção e não



apresenta uma limitação sobre o escopo da invenção de outra forma reivindicada. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado essencial para a prática da invenção.

Claudinas são uma família de proteínas que são os componentes mais importantes das junções firmes, onde elas estabelecem a barreira paracelular que controla o fluxo de moléculas no espaço intercelular entre as células de um epitélio. Claudinas são proteínas transmembranares que se rodeiam a membrana 4 vezes com ambas as extremidades N-terminal e C-terminal localizadas no citoplasma. A primeira alça extracelular consiste, em média, de 53 aminoácidos, e a segunda de cerca de 24 aminoácidos. CLDN6 e CLDN9 são os membros mais semelhantes da família CLDN.

O termo "CLDN", tal como aqui utilizado, significa claudina e inclui CLDN6, CLDN9, CLDN4 e CLDN3. De preferência, CLDN é uma CLDN humana.

O termo "CLDN6" de preferência se refere à CLDN6 humana e, em particular, a um (i) ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8, tal como um ácido nucleico compreendendo a sequência de ácido nucleico

da SEQ ID NO: 1 ou (ii) uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. A primeira alça extracelular de CLDN6 compreende de preferência os aminoácidos 28 a 80, mais preferivelmente os aminoácidos 28 a 76 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2 ou a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8, tal como a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7. A segunda alça extracelular de CLDN6 compreende de preferência os aminoácidos 138 a 160, de preferência os aminoácidos 141 a 159, mais preferivelmente os aminoácidos 145 a 157 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2 ou a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 8, tal como a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 6. As ditas primeira e segunda alças extracelulares formam, preferivelmente, a porção extracelular de CLDN6.

O termo "CLDN9" de preferência se refere à CLDN9 humana e, em particular, a (i) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 ou (ii) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. A primeira alça extracelular de CLDN9 compreende de preferência os aminoácidos 28 a 76 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9. A

segunda alça extracelular de CLDN9 compreende de preferência os aminoácidos 141 a 159 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9. As ditas primeira e segunda alças extracelulares formam, preferivelmente, a porção extracelular de CLDN9.

O termo "CLDN4" de preferência se refere à CLDN4 humana e, em particular, a (i) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10 ou (ii) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10. A primeira alça extracelular de CLDN4 compreende de preferência os aminoácidos 28 a 76 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10. A segunda alça extracelular de CLDN4 compreende de preferência os aminoácidos 141 a 159 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 10. As ditas primeira e segunda alças extracelulares formam, de preferência, a porção extracelular de CLDN4.

O termo "CLDN3" de preferência se refere à CLDN3 humana e, em particular, a (i) um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11 ou (ii) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. A primeira alça extracelular de CLDN3

compreende de preferência os aminoácidos 27 a 75 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11. A segunda alça extracelular de CLDN3 compreende de preferência os aminoácidos 140 a 158 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 11. As ditas primeira e segunda alças extracelulares formam, de preferência, a porção extracelular de CLDN3.

As sequências CLDN acima descritas incluem quaisquer variantes das ditas sequências, em particular mutantes, variantes de união, conformações, isoformas, variantes alélicas, variantes de espécies e homólogos de espécies, em particular aquelas que estão naturalmente presentes. Uma variante alélica se refere a uma alteração na sequência normal de um gene, o significado da qual sendo muitas vezes obscuro. O sequenciamento genético completo frequentemente identifica numerosas variantes alélicas para um determinado gene. Um homólogo de espécie é um ácido nucleico ou sequência de aminoácidos com uma espécie diferente da original de uma determinada sequência de ácidos nucleicos ou de aminoácidos. O termo "CLDN" deve englobar (i) as variantes de união de CLDN, (ii) as variantes de CLDN modificadas pós-traducionalmente, particularmente incluindo variantes com diferente glicosilação, tal como o status de N-glicosilação, (iii) as variantes de conformação de CLDN,

(iv) as variantes de CLDN relacionadas com câncer e as não-relacionadas com câncer. De preferência, uma CLDN está presente na sua conformação nativa.

Verificou-se que CLDN6 é expressa, por exemplo, no  
5 câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer gástrico, câncer da mama, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de pele, melanomas, câncer de cabeça e pescoço, sarcomas, câncer do ducto biliar, câncer de células renais e câncer de bexiga. CLDN6 é um alvo particularmente preferido para a  
10 prevenção e/ou tratamento de câncer do ovário, em particular adenocarcinoma do ovário e teratocarcinoma do ovário, câncer de pulmão, incluindo o câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC), em particular, carcinoma e adenocarcinoma  
15 de pulmão de células escamosas, câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de pele, em particular o carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno,  
20 sarcoma, em particular sarcoma sinovial e carcinosarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, em especial o carcinoma de células de transição e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de células renais incluindo o carcinoma de células renais de células claras e

carcinoma de células renais papilares, câncer de cólon, câncer do intestino delgado, incluindo o câncer do íleo, em particular o adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, 5 coriocarcinoma de placenta, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, um tumor de células germinativas, tal como um teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular 10 um tumor de células germinativas do testículo, e as suas formas metastáticas. Em uma modalidade, a doença cancerosa associada com a expressão de CLDN6 é selecionada a partir do grupo consistindo de câncer do ovário, câncer de pulmão, câncer de ovário metastático e câncer de pulmão 15 metastático. De preferência, o câncer de ovário é um carcinoma ou um adenocarcinoma. De preferência, o câncer de pulmão é um carcinoma ou um adenocarcinoma, e de preferência é o câncer bronquiolar, tal como carcinoma bronquiolar ou adenocarcinoma bronquiolar. Em uma 20 modalidade, a célula tumoral associada com a expressão de CLDN6 é uma célula de tal câncer.

O termo "porção" refere-se a uma fração. No que diz respeito a uma estrutura particular, como uma sequência de aminoácidos ou proteína, o termo "porção" do mesmo pode

designar uma fração contínua ou descontínua da dita estrutura. De preferência, uma porção de uma sequência de aminoácidos compreende pelo menos 1%, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, de preferência pelo menos 40%, de preferência pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% e mais preferivelmente pelo menos 90% dos aminoácidos da dita sequência de aminoácidos. De preferência, se a porção é uma fração descontínua, a dita fração descontínua é composta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais partes de uma estrutura, sendo cada parte um elemento contínuo da estrutura. Por exemplo, uma fração descontínua de uma sequência de aminoácidos pode ser composta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais, de preferência, não mais do que 4 partes da dita sequência de aminoácidos, em que cada parte compreende, preferivelmente, pelo menos 5 aminoácidos contínuos, pelo menos 10 aminoácidos contínuos, de preferência pelo menos 20 aminoácidos contínuos, de preferência pelo menos 30 aminoácidos contínuos da sequência de aminoácidos.

Os termos "parte" e "fragmento" são aqui utilizados alternadamente e se referem a um elemento contínuo. Por exemplo, uma parte de uma estrutura tal como uma sequência de aminoácidos ou proteína se refere a um elemento contínuo

da dita estrutura. Uma porção, uma parte ou um fragmento de uma estrutura compreende de preferência uma ou mais propriedades funcionais da dita estrutura. Por exemplo, uma porção, uma parte ou um fragmento de um epítopo ou peptídeo  
5 é, de preferência, imunologicamente equivalente ao epítopo ou peptídeo do qual ele é derivado.

O termo "uma porção extracelular de uma CLDN", no contexto da presente invenção, se refere a uma parte de uma CLDN de frente para o espaço extracelular de uma célula e,  
10 de preferência, sendo acessível a partir do exterior da dita célula, por exemplo, por anticorpos localizados fora da célula. De preferência, o termo se refere a uma ou mais alças extracelulares ou a uma parte delas ou qualquer outra parte extracelular de uma CLDN que é de preferência  
15 específica para a dita CLDN. Preferivelmente, a dita parte compreende, pelo menos 5, pelo menos 8, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 30 ou pelo menos 50 aminoácidos ou mais.

O termo "CLDN associada com a superfície de uma  
20 célula" é para ser entendido em relação à CLDN nativa, isto é, a CLDN em seu estado não desnaturado, de preferência naturalmente dobrada. De preferência, o termo "CLDN associada com a superfície de uma célula" significa que a CLDN está associada com e localizada na membrana plasmática



da dita célula, em que pelo menos uma parte da CLDN, de preferência a porção extracelular, fica de frente para o espaço extracelular da dita célula e é acessível a partir do exterior da dita célula, por exemplo, por anticorpos localizados fora da célula. A associação pode ser direta ou indireta. Por exemplo, a associação pode ser por um ou mais domínios transmembranares, uma ou mais âncoras lipídicas e/ou pela interação com qualquer outra proteína, lipídeo, sacarídeo ou outra estrutura que pode ser encontrada no folíolo externo da membrana plasmática de uma célula. Por exemplo, uma CLDN associada com a superfície de uma célula pode ser uma proteína transmembrana, isto é, uma proteína integral de membrana, tendo uma porção extracelular ou pode ser uma proteína associada com a superfície de uma célula através da interação com outra proteína que é uma proteína transmembrana.

CLDN6 está associada com a superfície de uma célula se ela estiver localizada na superfície da dita célula e for acessível à ligação por anticorpos específicos para CLDN6 adicionados à célula. Em modalidades preferidas, uma célula sendo caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular é uma célula que expressa CLDN6. É para ser entendido que, no caso em que CLDN6 é expressa pelas células, a CLDN6 associada com a superfície das ditas

células pode ser apenas uma porção da CLDN6 expressa.

O termo "uma célula transportando uma CLDN" significa, de preferência, que a dita célula transporta uma CLDN na sua superfície, isto é, que a CLDN está associada com a superfície da dita célula.

"Superfície celular" ou "superfície de uma célula" é utilizado de acordo com o seu significado normal na técnica e, assim, inclui o exterior da célula que é acessível à ligação por proteínas e outras moléculas.

A expressão "CLDN expressa na superfície de uma célula" significa que a CLDN expressa por uma célula se encontra em associação com a superfície da dita célula.

De acordo com a invenção, CLDN6 não é substancialmente expressa em uma célula e não está substancialmente associada com uma superfície da célula, se o nível de expressão e associação for menor em comparação com a expressão e associação em células da placenta ou tecido da placenta. De preferência, o nível de expressão e de associação é menor do que 10%, de preferência menor do que 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% ou 0,05% da expressão e associação em células da placenta ou tecidos da placenta ou ainda menos. De preferência, CLDN6 não é substancialmente expressa em uma célula e não está substancialmente associada com uma superfície celular se o nível de

expressão e associação excede o nível de expressão e de associação em tecido não tumorigênico ou não canceroso, exceto tecido da placenta, por não mais do que 2 vezes, de preferência 1,5 vez e, de preferência não excede o nível de expressão e de associação no dito tecido não tumorigênico, não canceroso. De preferência, CLDN6 não é substancialmente expressa em uma célula e não está substancialmente associada com uma superfície celular, se o nível de expressão ou associação está abaixo do limite de detecção e/ou se o nível de expressão ou associação é muito baixo para permitir a ligação por anticorpos específicos para CLDN6 adicionados às células.

De acordo com a invenção, CLDN6 é expressa em uma célula e está associada com uma superfície da célula, se o nível de expressão e de associação excede o nível de expressão e de associação em tecido não tumorigênico, não canceroso exceto tecido da placenta, de preferência em mais do que 2 vezes, de preferência 10 vezes, 100 vezes, 1000 vezes, ou 10000 vezes. De preferência, CLDN6 é expressa em uma célula e está associada com uma superfície celular, se o nível de expressão e de associação estiver acima do limite de detecção e/ou se o nível de expressão e de associação for alto o suficientemente para permitir a ligação por anticorpos específicos para CLDN6 adicionados

às células. De preferência, a CLDN6 expressa em uma célula é expressa ou exposta na superfície da dita célula.

O termo "micela" refere-se aos microdomínios de membrana ricos em esfingolipídeos e colesterol localizados na área do folíolo externo da membrana plasmática de uma célula. A capacidade de certas proteínas de se associar dentro de tais domínios e a capacidade de formação de "agregados" ou "agregados focais" pode afetar a função da proteína. Por exemplo, a translocação de moléculas CLDN6 em tais estruturas, depois de serem ligadas por meio dos anticorpos da presente invenção, cria uma elevada densidade de complexos antígeno-anticorpo de CLDN6 nas membranas plasmáticas. Tal densidade elevada de complexos antígeno-anticorpo de CLDN6 pode permitir a ativação eficiente do sistema complemento durante CDC.

De acordo com a invenção, o termo "doença" se refere a qualquer estado patológico, incluindo câncer, em particular aquelas formas de câncer aqui descritas.

"Doenças que envolvem as células que expressam CLDN6 e sendo caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares" significa, de acordo com a invenção, que a expressão e associação em células de um tecido ou órgão doente é, de preferência, aumentada em comparação com o estado em um tecido ou órgão saudável. Um aumento se

refere a um aumento de pelo menos 10%, em particular de  
pelo menos 20%, pelo menos 50%, pelo menos 100%, pelo menos  
200%, pelo menos 500%, pelo menos 1000%, pelo menos 10000%,  
ou mesmo mais. Em uma modalidade, a expressão e associação  
5 com a superfície celular é encontrada apenas em um tecido  
doente, enquanto que a expressão em um tecido saudável é  
reprimida. De acordo com a invenção, as doenças associadas  
com as células que expressam CLDN6 e sendo caracterizadas  
pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares  
10 incluem doenças tumorais, tais como doenças cancerígenas.  
Além disso, de acordo com a invenção, doenças tumorais,  
tais como doenças cancerígenas, de preferência são aquelas  
em que as células tumorais ou células cancerosas expressam  
CLDN6 e são caracterizadas pela associação de CLDN6 com as  
15 suas superfícies celulares.

Como utilizado no presente documento, uma "doença  
tumoral", "doença relacionada com o tumor" ou "doença  
tumorigênica" inclui uma doença caracterizada por  
crescimento celular regulado de forma aberrante,  
20 proliferação, diferenciação, adesão e/ou migração, o que  
pode resultar na produção de ou tendência para produzir  
tumores e/ou metástase de tumor. Por "célula tumoral" se  
entende uma célula anormal que cresce por uma proliferação  
celular descontrolada e rápida e continua a crescer mesmo

após os estímulos que iniciaram o novo crescimento terem cessado.

Por "tumor" se entende um grupo anormal de células ou um tecido que cresce por uma proliferação celular rápida e descontrolada e continua a crescer após os estímulos que iniciaram o novo crescimento terem cessado. Os tumores mostram falta parcial ou completa da organização estrutural e coordenação funcional com o tecido normal, e geralmente formam uma massa distinta de tecido, que pode ser benigna, pré-maligna ou maligna.

De preferência, uma "doença tumoral", "doença relacionado com tumor" ou "doença tumorigênica", de acordo com a invenção, é uma doença cancerígena, isto é, uma doença maligna e uma célula tumoral é uma célula cancerosa. De preferência, uma "doença tumoral", "doença relacionado com tumor" ou "doença tumorigênica" é caracterizada por células expressando CLDN6 e sendo caracterizada pela associação de CLDN6 com suas superfícies celulares e uma célula tumoral expressa CLDN6 e é caracterizada pela associação de CLDN6 com a sua superfície celular.

Uma célula que expressa CLDN6 e sendo caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular, de preferência é uma célula tumoral ou célula cancerígena, de preferência dos tumores e cânceres aqui descritos. De

preferência, tal célula é uma célula diferente de uma célula placentária.

Doenças cancerígenas ou cânceres preferidos, de acordo com a invenção, são selecionados do grupo consistindo de

5 câncer de ovário, em particular adenocarcinoma de ovário e teratocarcinoma de ovário, câncer de pulmão, incluindo câncer de pulmão de pequenas células (SCLC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), em particular carcinoma de pulmão de células escamosas e adenocarcinoma,

10 câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de pele, em particular carcinoma de célula basal e carcinoma de célula escamosa, melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço, em particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, em particular sarcoma

15 sinovial e carcinossarcoma, câncer do ducto biliar, câncer de bexiga, em particular o carcinoma de células de transição e carcinoma papilar, câncer de rim, em particular carcinoma de célula renal incluindo carcinoma renal de células claras e carcinoma celular papilar renal, câncer de

20 cólon, câncer do intestino delgado, incluindo o câncer do íleo, em particular adenocarcinoma do intestino delgado e adenocarcinoma do íleo, carcinoma embrionário testicular, coriocarcinoma placentário, câncer cervical, câncer testicular, em particular seminoma testicular, teratoma

testicular e câncer testicular embrionário, câncer uterino, um tumor de células germinativas, tal como teratocarcinoma ou um carcinoma embrionário, em particular um tumor de células germinativas do testículo, e as suas formas  
5 metastáticas.

Os principais tipos de cânceres de pulmão são o carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC) e o carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Existem três subtipos principais de carcinomas de pulmão de  
10 células não pequenas: carcinoma de pulmão de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma pulmonar de células grandes. Adenocarcinomas representam aproximadamente 10% dos cânceres de pulmão. Este câncer geralmente é visto  
periféricamente nos pulmões, ao contrário do câncer de  
15 pulmão de pequenas células e do câncer de pulmão de células escamosas, em que ambos tendem a ser localizados mais centralmente.

Câncer de pele é um crescimento maligno na pele. Os cânceres de pele mais comuns são câncer de célula basal, câncer de célula escamosa e melanoma. O melanoma maligno é  
20 um tipo grave de câncer de pele. Ocorre devido ao crescimento descontrolado de células de pigmento, chamadas melanócitos.

De acordo com a invenção, um "carcinoma" é um câncer



que começa na camada de revestimento (células epiteliais) dos órgãos.

5 "Carcinoma bronquiolar" é um carcinoma do pulmão, que acredita-se ser derivado do epitélio de bronquíolos terminais, em que o tecido neoplásico se estende ao longo das paredes alveolares e cresce em pequenas massas dentro dos alvéolos. Mucina podem ser demonstradas em algumas das células e no material nos alvéolos, que também inclui células desnudas.

10 "Adenocarcinoma" é um câncer que se origina no tecido glandular. Este tecido é também parte de uma categoria maior de tecido, conhecida como tecido epitelial. O tecido epitelial inclui a pele, glândulas e uma variedade de outros tecidos que revestem as cavidades e órgãos do corpo.

15 O epitélio é derivado embriologicamente do ectoderma, endoderma e mesoderma. Para ser classificado como adenocarcinoma, as células não precisam necessariamente fazer parte de uma glândula, contanto que elas tenham propriedades secretoras. Esta forma de carcinoma pode

20 ocorrer em alguns mamíferos superiores, incluindo seres humanos. Adenocarcinomas bem diferenciados tendem a assemelhar-se ao tecido glandular de que são derivados, embora os pouco diferenciados não possam. Ao corar as células de uma biópsia, um patologista irá determinar se o

tumor é um adenocarcinoma ou algum outro tipo de câncer. Adenocarcinomas podem surgir em muitos tecidos do corpo, devido à natureza ubíqua das glândulas dentro do corpo. Embora cada glândula pode não estar secretando a mesma substância, uma vez que existe uma função exócrina para a célula, ela é considerada glandular e sua forma maligna é, portanto, chamada adenocarcinoma. Adenocarcinomas malignos invadem outros tecidos e muitas vezes fazem metástase, dado tempo suficiente para fazer isto. O adenocarcinoma de ovário é o tipo mais comum de carcinoma de ovário. Ele inclui os adenocarcinomas serosos e mucinosos, o adenocarcinoma de células claras e o adenocarcinoma endometrióide.

"Cistadenocarcinoma" é uma forma maligna de um tumor epitelial-estromal de superfície, um tipo de câncer de ovário.

Tumores epiteliais-estromais de superfície são uma classe de neoplasmas de ovário que acredita-se que sejam derivados do epitélio da superfície do ovário (peritônio modificado) ou a partir do tecido endometrial ectópico ou do tecido da trompa de Falópio (tubário). Este grupo de tumores representa a maioria de todos os tumores de ovário.

Teratocarcinoma se refere a um tumor de células germinativas que é uma mistura de teratoma com carcinoma

embrionário, ou com coriocarcinoma, ou com ambos. Coriocarcinoma é um câncer maligno, trofoblástico e agressivo, geralmente da placenta. Ele é caracterizado pela disseminação hematogênica precoce para os pulmões.

5 Um sarcoma é um câncer do tecido conjuntivo (osso, cartilagem, gordura), resultando em proliferação do mesoderma. Isto é ao contrário dos carcinomas, que são de origem epitelial. Um sarcoma sinovial é uma forma rara de câncer que geralmente ocorre perto das articulações do  
10 braço ou perna. Ele um dos sarcomas dos tecidos moles.

Carcinoma de células renais, também conhecido como câncer de células renais ou adenocarcinoma de células renais é um câncer renal que se origina no revestimento do túbulo contorcido proximal, os tubos muito pequenos no rim  
15 que filtram o sangue e removem os produtos residuais. Carcinoma de célula renal é de longe o tipo mais comum de câncer renal em adultos e mais letal de todos os tumores genitourinários. Subtipos distintos de carcinoma de células renais são carcinoma de células renais de células claras e  
20 carcinoma de célula renal papilar. Carcinoma de célula renal de células claras é a forma mais comum de carcinoma de célula renal. Quando vistas sob um microscópio, as células que compõem o carcinoma de células renais de células claras parecem muito pálidas ou claras. Carcinoma

de células renais papilares é o segundo subtipo mais comum. Estes cânceres formam pequenas projeções tipo dedo (chamadas papilas) em alguns, se não na maioria, dos tumores.

5 Um tumor de células germinativas é um neoplasma derivado de células germinativas. Os tumores de células germinativas podem ser tumores cancerosos ou não cancerosos. Células germinativas normalmente ocorrem dentro das gônadas (ovários e testículos). Tumores de células  
10 germinativas que se originam fora das gônadas (por exemplo, na cabeça, dentro da boca, pescoço, pelve; em fetos, bebês e crianças pequenas são mais frequentemente encontrados na linha média do corpo, principalmente na ponta do cóccix) podem ser defeitos congênitos resultantes de erros durante  
15 o desenvolvimento do embrião.

As duas classes principais de tumores de células germinativas são os seminomas e não-seminomas, em que os não-seminomas incluem: teratocarcinoma, carcinoma embrionário, tumores do saco vitelino, coriocarcinoma e  
20 teratoma diferenciado. A maioria das linhagens celulares de não-seminomas são equivalentes aos carcinomas embrionários, isto é, elas são compostas quase inteiramente de células tronco que não se diferenciam em condições basais, embora algumas possam responder a indutores de diferenciação, tal

como o ácido retinóico.

Por "metástase" se entende a propagação de células cancerosas do seu lugar original para outra parte do corpo. A formação de metástases é um processo muito complexo e depende do desprendimento de células malignas do tumor primário, invasão da matriz extracelular, penetração das membranas basais endoteliais para entrar na cavidade corporal e vasos para, em seguida, serem transportadas pelo sangue e infiltrarem os órgãos-alvo. Finalmente, o crescimento de um novo tumor no sítio alvo depende da angiogênese. A metástase tumoral ocorre geralmente após a remoção do tumor primário porque as células tumorais ou componentes podem permanecer e desenvolver o potencial metastático. Em uma modalidade, o termo "metástase", de acordo com a invenção, se refere à "metástase distante", que se relaciona com uma metástase que está afastada do tumor primário e do sistema linfonodo regional.

As células de um tumor secundário ou metastático são como as células no tumor original. Isto significa, por exemplo, que, se o câncer de ovário fizer metástase para o fígado, o tumor secundário é composto de células ovarianas anormais, e não de células hepáticas anormais. O tumor no fígado é então chamado de câncer de ovário metastático, e não de câncer hepático.

Por "tratamento" se entende a administração de um composto ou composição como aqui descrito a um sujeito, a fim de prevenir ou eliminar uma doença, incluindo a redução do tamanho de um tumor ou o número de tumores em um indivíduo; interromper ou retardar uma doença em um indivíduo; inibir ou retardar o desenvolvimento de uma nova doença em um indivíduo; diminuir a frequência ou severidade dos sintomas e/ou recorrências em um indivíduo que atualmente tem ou que já teve anteriormente uma doença; e/ou prolongar, isto é, aumentar a expectativa de vida do indivíduo.

O termo "tratamento de uma doença" inclui a cura, redução da duração, melhoria, prevenção, diminuição ou inibição da progressão ou agravamento, ou prevenção ou retardo do início de uma doença ou dos sintomas da mesma.

Por "estando em risco" se entende um indivíduo, isto é, um paciente, que é identificado como tendo uma chance acima da normalidade de desenvolver uma doença, em particular o câncer, em comparação com a população em geral. Além disso, um indivíduo que tenha tido, ou que tem atualmente uma doença, em particular o câncer, é um indivíduo que tem maior risco para o desenvolvimento de uma doença, uma vez que um indivíduo pode continuar a desenvolver uma doença. Indivíduos que atualmente têm, ou

que tiveram câncer também têm um risco aumentado para a metástase do câncer.

O termo "imunoterapia" refere-se a um tratamento que envolve uma reação imune específica. No contexto da presente invenção, termos como "proteger", "prevenir", "profilático", "preventivo" ou "protetor" se referem à prevenção ou tratamento ou ambos, da ocorrência e/ou propagação de um tumor em um indivíduo. O termo "imunoterapia" no contexto da presente invenção se refere, de preferência, à imunização do tumor ativo ou vacinação do tumor. Uma administração profilática de uma imunoterapia, por exemplo, uma administração profilática da composição da invenção, de preferência protege o receptor do desenvolvimento do crescimento tumoral. Uma administração terapêutica de uma imunoterapia, por exemplo, uma administração terapêutica da composição da invenção, pode levar à inibição do progresso/crescimento do tumor. Isto compreende a desaceleração do progresso/crescimento do tumor, em particular uma interrupção da progressão do tumor, que preferencialmente leva à eliminação do tumor. Uma administração terapêutica de uma imunoterapia pode proteger o indivíduo, por exemplo, da disseminação ou metástase de tumores já existentes.

O termo "imunização" ou "vacinação" descreve o

processo de administração de antígeno a um indivíduo com a finalidade de induzir uma resposta imune por razões terapêuticas ou profiláticas.

Os termos "indivíduo", "individual", "organismo" ou "paciente" são usados indistintamente e se referem aos vertebrados, de preferência aos mamíferos. Por exemplo, mamíferos, no contexto da presente invenção são seres humanos, primatas não humanos, animais domesticados tais como cães, gatos, ovelhas, bovinos, cabras, porcos, cavalos, etc., animais de laboratório tais como camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, etc., bem como animais em cativeiro como animais de zoológicos. O termo "animal", como aqui utilizado, inclui também os seres humanos. O termo "indivíduo" pode também incluir um paciente, isto é, um animal, preferivelmente um ser humano com uma doença, de preferência uma doença associada com a expressão da CLDN6, de preferência uma doença tumorigênica tal como um câncer.

O termo "adjuvante" se refere aos compostos que prolongam ou intensificam ou aceleram uma resposta imune. A composição da presente invenção de preferência exerce o seu efeito sem a adição de adjuvantes. Ainda assim, a composição do presente pedido de patente pode conter qualquer adjuvante conhecido. Adjuvantes compreendem um



grupo heterogêneo de compostos tais como emulsões de óleo (por exemplo, adjuvantes de Freund), compostos minerais (tais como alúmen), produtos bacterianos (tal como a toxina de *Bordetella pertussis*), lipossomas e complexos imunoestimulantes. Exemplos de adjuvantes são monofosforil-lipídeo A (MPL SmithKline Beecham). Saponinas, tais como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 e QS-L1 (So e col., 1997, Mol. Cells 7: 178-186), adjuvantes de Freund incompletos, adjuvantes de Freund completos, vitamina E, montanide, alúmen, oligonucleotídeos CpG (Krieg e col., 1995, Nature 374: 546-549), e várias emulsões água-em-óleo, que são preparadas a partir de óleos biologicamente degradáveis, tais como o esqualeno e/ou tocoferol.

De acordo com a invenção, uma amostra pode ser qualquer amostra útil de acordo com a presente invenção, em particular uma amostra biológica como amostra de tecido, incluindo fluidos corporais e/ou uma amostra celular, que pode ser obtida da maneira convencional, tal como por biópsia de tecido, incluindo biópsia por punção, e tomando amostra de sangue, aspirado brônquico, escarro, urina, fezes ou outros fluidos corporais. De acordo com a invenção, o termo "amostra biológica" também inclui frações de amostras biológicas.

O termo "anticorpo" se refere a uma glicoproteína que compreende pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por pontes dissulfeto, e inclui qualquer molécula que compreende uma porção de  
5 ligação ao antígeno do mesmo. O termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais e fragmentos ou derivados dos mesmos, incluindo, sem limitação, anticorpos monoclonais humanos, anticorpos monoclonais humanizados, anticorpos monoclonais quiméricos, anticorpos de cadeia simples, por  
10 exemplo, scFv e fragmentos de anticorpo de ligação a antígeno como fragmentos Fab e Fab' e inclui também todas as formas recombinantes de anticorpos, por exemplo, anticorpos expressos em procariotos, anticorpos não glicosilados e quaisquer fragmentos de anticorpo de ligação  
15 ao antígeno e derivados, como aqui descritos. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia pesada (aqui abreviado como VH) e uma região constante da cadeia pesada. Cada cadeia leve é composta por uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região  
20 constante da cadeia leve. As regiões VH e VL podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de regiões de determinação de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de estrutura (FR). Cada VH e VL é composta por

três CDRs e quatro FRs, dispostos do terminal amino para o terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos do hospedeiro ou fatores, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema complemento clássico.

10 De acordo com a invenção, o termo "pelo menos uma das sequências CDR" significa de preferência pelo menos a sequência CDR3. O termo "sequências de CDR de uma cadeia de anticorpo" de preferência se refere a CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada ou cadeia leve de um anticorpo.

15 De acordo com a invenção, uma referência a uma cadeia de anticorpo compreendendo uma sequência CDR particular tal como uma sequência CDR3 particular significa que a dita sequência CDR particular forma a região CDR, tal como a região CDR3 da dita cadeia de anticorpo, isto é, a região CDR consiste da dita sequência CDR particular, ou forma uma parte da região CDR, tal como a região CDR3 da dita cadeia de anticorpo, isto é, a região CDR compreende a dita sequência CDR particular.

Se de acordo com a invenção for feita referência a um

anticorpo que compreende uma cadeia pesada particular de anticorpo e/ou uma cadeia leve particular de anticorpo, tal como uma cadeia compreendendo sequências CDR particulares, é preferível que ambas as cadeias pesadas e/ou ambas as cadeias leves do anticorpo sejam, cada uma composta da cadeia pesada particular de anticorpo e/ou da cadeia leve particular de anticorpo.

O termo "anticorpo humanizado" se refere a uma molécula com um sítio de ligação a antígeno que é substancialmente derivado de uma imunoglobulina de uma espécie não humana, em que a estrutura de imunoglobulina restante da molécula é baseada na estrutura e/ou na sequência de uma imunoglobulina humana. O sítio de ligação ao antígeno pode compreender domínios variáveis completos fundidos em domínios constantes ou apenas as regiões de determinação de complementaridade (CDR) enxertadas em regiões de estrutura apropriadas nos domínios variáveis. Sítios de ligação a antígeno podem ser de tipo selvagem ou modificados por uma ou mais substituições de aminoácidos, por exemplo, modificados para se assemelhar com imunoglobulinas humanas de forma mais precisa. Algumas formas de anticorpos humanizados preservam todas as sequências CDR (por exemplo, um anticorpo humanizado de camundongo que contém todas as seis CDRs do anticorpo de

camundongo). Outras formas têm uma ou mais CDRs que são alteradas em relação ao anticorpo original.

O termo "anticorpo quimérico" se refere àqueles anticorpos em que uma porção de cada uma das sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve é homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe particular, enquanto que o segmento restante da cadeia é homólogo às sequências correspondentes em outra. Tipicamente, a região variável das cadeias leve e pesada mimetiza as regiões variáveis de anticorpos derivados de uma espécie de mamíferos, enquanto que as porções constantes são homólogas às sequências de anticorpos derivadas de outra. Uma vantagem evidente para tais formas quiméricas é que a região variável pode ser convenientemente derivada de fontes atualmente conhecidas usando células B ou hibridomas prontamente disponíveis de organismos hospedeiros não humanos em combinação com regiões constantes derivadas de, por exemplo, preparações de células humanas. Embora a região variável tenha a vantagem da facilidade de preparação e a especificidade não ser afetada pela fonte, a região constante sendo humana, é menos provável de extrair uma resposta imune a partir de um indivíduo humano, quando os anticorpos são injetados do que seria com a região

constante a partir de uma fonte não humana. No entanto, a definição não está limitada a este exemplo particular.

O termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente, "porção de ligação"), tal como aqui utilizado, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total.

Exemplos de fragmentos de ligação englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consistem de domínios VL, VH, CL e CH; (ii) fragmentos  $F(ab')_2$ , fragmentos bivalentes que compreendem dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) fragmentos Fd consistindo dos domínios VH e CH; (iv) fragmentos Fv consistindo dos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) fragmentos dAb (Ward col., (1989) Nature 341: 544-546), que consistem de um domínio VH; (vi) regiões de determinação de complementaridade isoladas (CDR) e (vii) combinações de duas ou mais CDRs isoladas que podem, opcionalmente, ser unidas por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes

separados, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que eles sejam feitos como uma cadeia de proteína única em que as regiões VL e VH pareiam para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia única Fv (scFv); ver, por exemplo, Bird e col. (1988) Science 242: 423-426; e Huston e col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples também se destinam a serem englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo. Outro exemplo são as proteínas de fusão ao domínio de ligação de imunoglobulina, compreendendo (i) um domínio de ligação ao polipeptídeo que é fundido a um polipeptídeo da região de dobradiça da imunoglobulina, (ii) uma região constante CH2 da cadeia pesada de imunoglobulina fundida à região de dobradiça, e (iii) uma região constante CH3 da cadeia pesada de imunoglobulina fundida com a região constante CH2. O domínio de ligação ao polipeptídeo pode ser uma região variável da cadeia pesada ou uma região variável da cadeia leve. As proteínas de fusão aos domínios de ligação da imunoglobulina são adicionalmente divulgadas em US 2003/0118592 e US 2003/0133939. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos utilizando técnicas convencionais conhecidas pelas pessoas versadas na técnica, e os fragmentos são testados quanto à utilidade da mesma maneira

que os anticorpos intactos.

O termo "epítopo" se refere a um determinante antigênico em uma molécula, isto é, à parte em uma molécula que é reconhecida pelo sistema imune, por exemplo, que é reconhecida por um anticorpo. Por exemplo, os epítopos são os sítios tridimensionais discretos de um antígeno, que são reconhecidos pelo sistema imune. No contexto da presente invenção, o epítopo é preferencialmente derivado de uma proteína CLDN. Epítopos consistem geralmente de agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos em que a ligação ao primeiro, mas não ao último, é perdida na presença de solventes de desnaturação. Um epítopo de uma proteína, tal como CLDN compreende de preferência uma porção contínua ou descontínua da dita proteína e possui, de preferência, entre 5 e 100, de preferência entre 5 e 50, mais preferivelmente entre 8 e 30, mais preferivelmente entre 10 e 25 aminoácidos de comprimento, por exemplo, o epítopo pode ser preferivelmente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 aminoácidos de



comprimento.

O termo "epítopo descontínuo", como aqui usado, significa um epítopo conformacional em um antígeno proteico que é formado a partir de pelo menos duas regiões separadas na sequência primária da proteína.

O termo "molécula biespecífica" se destina a incluir qualquer agente, por exemplo, uma proteína, peptídeo ou complexo de proteína ou peptídeo, que tem duas especificidades de ligação diferentes. Por exemplo, a molécula pode se ligar, ou interagir com (a) um antígeno de superfície celular, e (b) um receptor Fc na superfície de uma célula efetora. O termo "molécula multiespecífica" ou "molécula heteroespecífica" pretende incluir qualquer agente, por exemplo, uma proteína, peptídeo ou complexo de proteína ou peptídeo, que tem mais do que duas especificidades de ligação diferentes. Por exemplo, a molécula pode se ligar a, ou interagir com (a) um antígeno de superfície celular, (b) um receptor Fc na superfície de uma célula efetora e (c) pelo menos um outro componente. Por conseguinte, a invenção inclui, mas não está limitada, a moléculas biespecíficas, triespecíficas, tetraesecíficas e outras multiespecíficas que são direcionadas para CLDN6, e para outros alvos, tais como receptores Fc em células efetoras. O termo "anticorpos biespecíficos" também inclui

diacorpos. Os diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos em que os domínios VH e VL são expressos em uma única cadeia polipeptídica, mas utilizando um ligante que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, deste modo, forçando os domínios a emparelhar com domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação ao antígeno (ver, por exemplo, Holliger, P., e col.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., e col. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Tal como aqui utilizado, o termo "heteroanticorpos" se refere a dois ou mais anticorpos, seus derivados ou regiões de ligação ao antígeno unidas, pelo menos, dois dos quais possuindo especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluem uma especificidade de ligação para um receptor Fc em uma célula efetora, e uma especificidade de ligação para um antígeno ou epítipo em uma célula alvo, por exemplo, uma célula tumoral.

Os anticorpos aqui descritos podem ser anticorpos humanos. O termo "anticorpo humano", como utilizado no presente documento, destina-se a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de

aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou sítio-específica *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*).

5 O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui utilizado, se refere a uma preparação de moléculas de anticorpo de composição molecular única. Um anticorpo monoclonal apresenta especificidade e afinidade de ligação  
10 únicas para um epítopo particular. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais são produzidos por um hibridoma, que inclui uma célula B obtida de um animal não humano, por exemplo, camundongo, fundida com uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo recombinante", tal como aqui utilizado, inclui todos os anticorpos que são preparados,  
15 expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo), que é transgênico ou transcromossomal em relação aos genes da imunoglobulina ou um hibridoma preparado a partir deste, (b) anticorpos isolados de uma  
20 célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, de um transfectoma, (c) anticorpos isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos recombinantes, combinatória, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por quaisquer outros meios que envolvem

a união de sequências de genes da imunoglobulina a outras sequências de DNA.

O termo "transfectoma", tal como utilizado no presente documento, inclui células hospedeiras eucarióticas recombina-  
5 tes que expressam um anticorpo, tais como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetais ou fungos, incluindo células de levedura.

Como utilizado no presente documento, um "anticorpo heterólogo" é definido em relação a um organismo  
10 transgênico que produz tal anticorpo. Este termo se refere a um anticorpo que tem uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de ácidos nucleicos codificante correspondente àquela encontrada em um organismo que não consiste no organismo transgênico, e sendo geralmente derivada de uma  
15 espécie diferente do organismo transgênico.

Como utilizado no presente documento, um "anticorpo heterohíbrido" se refere a um anticorpo que possui cadeias  
leves e pesadas de diferentes origens de organismos. Por exemplo, um anticorpo possuindo uma cadeia pesada humana  
20 associada com uma cadeia leve de murino é um anticorpo heterohíbrido.

A invenção inclui todos os anticorpos e derivados de anticorpos, tais como aqui descritos que, para as finalidades da invenção, são englobados pelo termo

"anticorpo". O termo "derivados de anticorpo" se refere a qualquer forma modificada de um anticorpo, por exemplo, um conjugado do anticorpo e outro agente ou anticorpo, ou a um fragmento de anticorpo.

5 Os anticorpos descritos no presente documento estão preferivelmente isolados. Um "anticorpo isolado", tal como aqui utilizado, pretende se referir a um anticorpo que é substancialmente livre de outros anticorpos com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo  
10 isolado que se liga especificamente à CLDN6 é substancialmente livre de anticorpos que se ligam especificamente a antígenos diferentes de CLDN6). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo, isoforma ou variante de CLDN6 humana pode, no entanto, ter  
15 reatividade cruzada com outros antígenos relacionados, por exemplo, de outras espécies (por exemplo, homólogos de espécies CLDN6). Além disso, um anticorpo isolado pode estar substancialmente livre de outro material celular e/ou produtos químicos. Em uma modalidade da invenção, uma  
20 combinação de anticorpos monoclonais "isolados" se refere aos anticorpos com diferentes especificidades e sendo combinados em uma composição bem definida.

De acordo com a presente invenção, um anticorpo é capaz de se ligar a um alvo predeterminado, se ele tem uma

afinidade significativa para o dito alvo predeterminado e se liga ao dito alvo predeterminado em ensaios padrão, tais como os ensaios descritos no presente documento. De preferência, um anticorpo é capaz de se ligar a um alvo se ele se ligar detectavelmente ao dito alvo em uma análise de citometria de fluxo (análise FACS) em que a ligação do dito anticorpo ao dito alvo expresso na superfície de células intactas é determinada. De preferência, o anticorpo se liga detectavelmente ao dito alvo, caso esteja presente em uma concentração de 10 µg/ml ou menos, 5 µg/ml ou menos, ou 2 µg/mL ou menos. De preferência, o anticorpo se liga de modo detectável ao dito alvo, se presente em uma concentração de 50 nM ou menos, 30 nM ou menos ou 15 nM ou menos. "Afinidade" ou "afinidade de ligação" é geralmente medida pela constante de dissociação de equilíbrio ( $K_D$ ). De preferência, o termo "afinidade significativa" se refere à ligação a um alvo predeterminado com uma constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  M ou menos,  $10^{-6}$  M ou menos,  $10^{-7}$  M ou menos,  $10^{-8}$  M ou menos,  $10^{-9}$  M ou menos,  $10^{-10}$  M ou menos,  $10^{-11}$  M ou menos, ou  $10^{-12}$  M ou menos. Os anticorpos da presente invenção têm, de preferência, valores de EC50 para a ligação à CLDN6 de 6500 ng/ml ou menos, 3000 ng/ml ou menos, 2500 ng/ml ou menos, 2000 ng/ml ou menos, 1500 ng/ml

ou menos, 1000 ng/ml ou menos, 500 ng/ml ou menos, 400 ng/ml ou menos, 300 ng/ml ou menos, 200 ng/ml ou menos, ou 100 ng/ml ou menos.

Um anticorpo não é (substancialmente) capaz de se ligar a um alvo se ele não tem afinidade significativa pelo dito alvo e não se liga significativamente ao dito alvo em ensaios padrão. De preferência, um anticorpo não é (substancialmente) capaz de se ligar a um alvo se ele não se ligar detectavelmente ao dito alvo em uma análise de citometria de fluxo (análise FACS) em que a ligação do dito anticorpo ao dito alvo expresso na superfície de células intactas é determinada. De preferência, o anticorpo não se liga detectavelmente ao dito alvo se estiver presente em uma concentração de até 2  $\mu\text{g/ml}$ , de preferência até 5  $\mu\text{g/mL}$ , de preferência até 10  $\mu\text{g/ml}$ , de preferência até 20  $\mu\text{g/mL}$ , mais preferivelmente até 50  $\mu\text{g/ml}$ , em particular até 100  $\mu\text{g/mL}$ , ou até 150  $\mu\text{g/mL}$ , até 200  $\mu\text{g/ml}$  ou mais. De preferência, o anticorpo não se liga detectavelmente ao dito alvo se estiver presente em uma concentração de até 15 nM, de preferência até 30 nM, de preferência até 50 nM, de preferência até 100 nM, de preferência até 150 nM, ou até 170 nM, até 300 nM, até 600 nM, até 1000 nM, até 1300 nM ou mais. De preferência, o anticorpo não se liga

detectavelmente ao dito alvo se estiver presente em uma concentração que satura a ligação ao alvo a que o anticorpo se liga, isto é, CLDN6. De preferência, um anticorpo não tem afinidade significativa para um alvo, se ele se liga ao  
 5 dito alvo com uma  $K_D$  que é pelo menos 10 vezes, 100 vezes,  $10^3$  vezes,  $10^4$  vezes,  $10^5$  vezes ou  $10^6$  vezes maior do que a  $K_D$  para a ligação ao alvo predeterminado a que o anticorpo é capaz de se ligar. Por exemplo, se a  $K_D$  para a ligação de um anticorpo ao alvo a que o anticorpo é capaz de se ligar  
 10 é de  $10^{-7}$  M, a  $K_D$  para a ligação a um alvo para o qual o anticorpo não tem nenhuma afinidade significativa seria de pelo menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M ou  $10^{-1}$  M.

Um anticorpo é específico para um alvo predeterminado se ele é capaz de se ligar ao dito alvo predeterminado,  
 15 enquanto não é capaz de se ligar a outros alvos, isto é, não tem nenhuma afinidade significativa para outros alvos e não se liga significativamente a outros alvos em ensaios padrão. De acordo com a invenção, um anticorpo é específico para CLDN6 se ele for capaz de se ligar à CLDN6, mas não é  
 20 capaz de se ligar a outros alvos, em particular proteínas claudina diferentes de CLDN6, como CLDN9, CLDN4, CLDN3 e CLDN1. De preferência, um anticorpo é específico para CLDN6 se a afinidade por e a ligação a uma proteína claudina diferente de CLDN6, tal como CLDN9, CLDN4, CLDN3 e CLDN1,



não exceder significativamente a afinidade para ou a ligação às proteínas claudina não relacionadas, tais como albumina de soro bovino (BSA), caseína, albumina de soro humano (HSA) ou proteínas transmembrana que não são claudina, tais como moléculas MHC ou receptor de transferrina, ou qualquer outro polipeptídeo especificado. De preferência, um anticorpo é específico para um alvo predeterminado se ele se liga ao dito alvo com uma  $K_D$  que é pelo menos 10 vezes, 100 vezes,  $10^3$  vezes,  $10^4$  vezes,  $10^5$  vezes ou  $10^6$  vezes menor do que a  $K_D$  para a ligação a um alvo para o qual não é específico. Por exemplo, se a  $K_D$  para a ligação de um anticorpo ao alvo para o qual ele é específico é  $10^{-7}$  M, a  $K_D$  para a ligação a um alvo para o qual ele não é específico seria de pelo menos  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M ou  $10^{-1}$  M.

A ligação de um anticorpo a um alvo pode ser determinada experimentalmente usando qualquer método adequado; ver, por exemplo, Berzofsky e col., "Antibody-Antigen Interactions" em Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nova Iorque, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company Nova Iorque, N Y (1992), e métodos aqui descritos. As afinidades podem ser facilmente determinadas utilizando técnicas convencionais, tais como por diálise de equilíbrio; usando o instrumento

BIAcore 2000, utilizando os procedimentos gerais descritos pelo fabricante; por radioimunoensaio utilizando antígeno alvo radiomarcado; ou por outro método conhecido pela pessoa versada na técnica. Os dados de afinidade podem ser  
5 analisados, por exemplo, pelo método de Scatchard e col., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). A afinidade medida de uma interação anticorpo-antígeno particular pode variar se for medida sob diferentes condições, por exemplo, concentração salina, pH. Assim, as medições de afinidade e  
10 outros parâmetros de ligação ao antígeno, por exemplo,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , são de preferência feitas com soluções padronizadas de anticorpo e antígeno e um tampão padronizado.

Uma característica única do anticorpo da presente invenção é a capacidade de se ligar à claudina 6 da  
15 superfície da célula. Isto é demonstrado por análise de citometria de fluxo de células que expressam claudina 6.

Para testar a ligação dos anticorpos monoclonais às células vivas expressando claudinas, a citometria de fluxo pode ser usada. Resumidamente, as linhagens celulares que  
20 expressam claudinas associadas à membrana (cultivadas sob condições de crescimento padrão) são misturadas com várias concentrações de anticorpos em PBS contendo 2% de FCS inativado por calor e 0,1% de  $NaN_3$  a 4°C durante 30 min. Após lavagem, as células reagem com um anticorpo secundário

marcado por fluorescência sob as mesmas condições de coloração do anticorpo primário. As amostras podem ser analisadas por FACS usando propriedades de dispersão lateral e luz para entrada em células individuais e a  
5 ligação dos anticorpos marcados é determinada.

O termo "ligação", de acordo com a invenção, de preferência se refere a uma ligação específica, tal como aqui definido.

Tal como aqui utilizado, "isotipo" se refere à classe  
10 de anticorpos (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificada por genes da região constante da cadeia pesada.

Tal como aqui utilizado, "comutação de isotipo" se refere ao fenômeno pelo qual a classe ou isotipo de um anticorpo muda de uma classe Ig para uma das outras classes  
15 de Ig.

O termo "ocorrência natural", tal como aqui utilizado, conforme aplicado a um objeto, se refere ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que está  
20 presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório é de ocorrência natural.

O termo "rearranjado", tal como aqui utilizado, se

refere a uma configuração de um *locus* de imunoglobulina de cadeia pesada ou cadeia leve, em que um segmento V está posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou J em uma conformação que codifica essencialmente um domínio VH ou VL completo, respectivamente. Um *locus* de gene de imunoglobulina rearranjada (anticorpo) pode ser identificado por comparação com o DNA da linhagem germinativa; um *locus* rearranjado terá pelo menos um elemento de homologia de heptâmero/nonâmero recombinado.

10 O termo "não rearranjado" ou "configuração de linhagem germinativa", tal como aqui utilizado em referência a um segmento V, se refere à configuração em que o segmento V não é recombinado de modo a estar imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

15 O termo "molécula de ácido nucleico", tal como aqui utilizado, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de cadeia simples ou de cadeia dupla, mas de preferência é DNA de cadeia dupla. Uma molécula de ácido nucleico pode ser empregada para introdução em, isto é, transfecção de  
20 células, por exemplo, sob a forma de RNA, que pode ser preparada por transcrição *in vitro* a partir de um molde de DNA. O RNA pode, além disso, ser modificado antes da aplicação por sequências de estabilização, cobertura e

poliadenilação.

Os ácidos nucleicos descritos de acordo com a invenção foram preferivelmente isolados. O termo "ácido nucleico isolado" significa, de acordo com a invenção, que o ácido nucleico foi (i) amplificado *in vitro*, por exemplo, por reação em cadeia da polimerase (PCR), (ii) produzido de forma recombinante por clonagem, (iii) purificado, por exemplo, por clivagem e fracionamento eletroforético em gel, ou (iv) sintetizado, por exemplo, por síntese química.

Um ácido nucleico isolado é um ácido nucleico que está disponível para a manipulação por técnicas de DNA recombinante.

Os ácidos nucleicos podem, de acordo com a invenção, estar presentes sozinhos ou em combinação com outros ácidos nucleicos, que podem ser homólogos ou heterólogos. Em modalidades preferidas, um ácido nucleico está funcionalmente ligado às sequências de controle de expressão que podem ser homólogas ou heterólogas em relação ao dito ácido nucleico, em que o termo "homólogo" significa que o ácido nucleico também está funcionalmente ligado à sequência de controle de expressão naturalmente, e o termo "heterólogo" significa que o ácido nucleico não está funcionalmente ligado à sequência de controle de expressão naturalmente.

Um ácido nucleico, tal como um ácido nucleico que expressa RNA e/ou proteína ou peptídeo, e uma sequência de controle de expressão são "funcionalmente" ligados um ao outro se eles estão covalentemente ligados entre si de tal forma que a expressão ou transcrição do dito ácido nucleico está sob o controle ou sob a influência da dita sequência de controle de expressão. Se o ácido nucleico deve ser traduzido em uma proteína funcional, então, com uma sequência de controle de expressão funcionalmente ligada a uma sequência codificadora, a indução da dita sequência de controle de expressão resulta na transcrição do dito ácido nucleico, sem causar uma mudança de estrutura na sequência codificadora ou dita sequência codificadora não sendo capaz de ser traduzida na proteína ou peptídeo desejado.

O termo "sequência de controle de expressão" compreende, de acordo com os promotores da invenção, sítios de ligação de ribossomo, intensificadores e outros elementos de controle que regulam a transcrição de um gene ou tradução de um mRNA. Em modalidades particulares da invenção, as sequências de controle da expressão podem ser reguladas. A estrutura exata das sequências de controle de expressão pode variar como uma função da espécie ou tipo de célula, mas em geral compreende sequências 5' não transcritas e 5' e 3' não traduzidas, que estão envolvidas

no início da transcrição e da tradução, respectivamente, tais como *TATA box*, sequência de nivelamento, sequência CAAAT e similares. Mais especificamente, as sequências de controle de expressão 5' não transcritas compreendem uma  
5 região promotora que inclui uma sequência promotora para o controle transcricional do ácido nucleico funcionalmente ligado. Sequências de controle de expressão podem também compreender sequências intensificadoras ou sequências ativadoras à montante.

10 De acordo com a invenção, o termo "promotor" ou "região promotora" se refere a uma sequência de ácido nucleico que está localizada à montante (5') em relação à sequência de ácido nucleico sendo expressa e que controla a expressão da sequência pelo fornecimento de um sítio de  
15 reconhecimento e de ligação para a RNA-polimerase. A "região promotora" pode incluir sítios de reconhecimento e ligação adicionais para fatores adicionais que estão envolvidos na regulação da transcrição de um gene. Um promotor pode controlar a transcrição de um gene  
20 procariótico ou eucariótico. Além disso, um promotor pode ser "induzível" e pode iniciar a transcrição em resposta a um agente indutor ou pode ser "constitutivo" se a transcrição não é controlada por um agente indutor. Um gene que está sob o controle de um promotor induzível não é

expresso, ou é expresso apenas em pequena extensão, se um agente indutor estiver ausente. Na presença do agente indutor, o gene é ligado ou o nível de transcrição é aumentado. Isto é mediado, em geral, pela ligação de um  
5 fator de transcrição específico.

Promotores que são preferidos de acordo com a invenção incluem promotores para a SP6, T3 e T7 polimerase, promotor de RNA U6 humano, promotor de CMV e promotores híbridos artificiais dos mesmos (por exemplo, CMV), onde uma parte  
10 ou partes são fundidas com uma parte ou partes dos promotores dos genes de outras proteínas celulares, tais como, por exemplo, GAPDH humana (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e incluindo ou não incluindo íntron(s) adicional/adicionais.

15 De acordo com a invenção, o termo "expressão" é usado no seu sentido mais geral, e compreende a produção de RNA ou de RNA e proteína/peptídeo. Ele também compreende a expressão parcial de ácidos nucleicos. Além disso, a expressão pode ser realizada de forma transiente ou de  
20 forma estável. De acordo com a invenção, o termo expressão também inclui uma "expressão aberrante" ou "expressão anormal".

"Expressão aberrante" ou "expressão anormal" significa, de acordo com a invenção, que a expressão é



alterada, de preferência aumentada, em comparação com uma referência, de preferência em comparação com o estado em uma célula normal não tumorigênica ou um indivíduo saudável. Um aumento na expressão se refere a um aumento de 5 pelo menos 10%, em particular pelo menos 20%, pelo menos 50% ou pelo menos 100%. Em uma modalidade, a expressão é encontrada apenas em um tecido doente, enquanto que a expressão em um tecido saudável é reprimida.

Em uma modalidade preferida, uma molécula de ácido 10 nucleico está, de acordo com a invenção, presente em um vetor, quando apropriado com um promotor, que controla a expressão do ácido nucleico. O termo "vetor" é aqui utilizado no seu sentido mais geral e compreende qualquer veículo intermediário para um ácido nucleico que permite 15 que o dito ácido nucleico, por exemplo, seja introduzido em células procarióticas e/ou eucarióticas e, quando apropriado, seja integrado em um genoma. Vetores deste tipo são, de preferência, replicados e/ou expressos nas células. Os vetores compreendem plasmídeos, fagomídeos, 20 bacteriófagos ou genomas virais. O termo "plasmídeo", tal como aqui utilizado, geralmente se refere a uma construção de material genético extracromossômico, geralmente um duplex de DNA circular, que pode se replicar independentemente do DNA cromossômico.

Como o vetor para a expressão de um anticorpo, tanto um tipo de vetor em que a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo estão presentes em diferentes vetores ou um tipo de vetor em que a cadeia pesada e a cadeia leve estão presentes no mesmo vetor pode ser utilizado.

O ensinamento dado pelo presente documento em relação ao ácido nucleico específico e as sequências de aminoácidos, por exemplo, aquelas mostradas na listagem de sequências, é para ser interpretado de forma a também se referir às modificações, isto é, variantes das ditas sequências específicas que resultam nas sequências que são funcionalmente equivalentes às ditas sequências específicas, por exemplo, sequências de aminoácidos exibindo propriedades idênticas ou semelhantes às das sequências de aminoácidos e sequências de ácidos nucleicos específicas que codificam as sequências de aminoácidos que exibem propriedades idênticas ou semelhantes às das sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências de ácidos nucleicos específicas. Uma propriedade importante é reter a ligação de um anticorpo ao seu alvo ou manter as funções efectoras de um anticorpo, tais como CDC e/ou ADCC. De preferência, uma sequência modificada em relação a uma sequência específica, quando ela substitui a sequência específica em um anticorpo, retém a ligação do dito

anticorpo ao alvo e de preferência as funções do dito anticorpo, como aqui descrito.

Do mesmo modo, o ensinamento dado no presente documento com relação aos anticorpos específicos, ou  
5 hibridomas produtores de anticorpos específicos, deve ser interpretado de forma a também se referir aos anticorpos caracterizados por uma sequência de aminoácidos e/ou sequência de ácidos nucleicos que é modificada em  
10 comparação com a sequência de aminoácidos e/ou a sequência de ácidos nucleicos dos anticorpos específicos, porém sendo funcionalmente equivalentes. Uma propriedade importante é reter a ligação de um anticorpo ao seu alvo ou manter as funções efetoras de um anticorpo. De preferência, uma  
15 sequência modificada em relação a uma sequência específica, quando ela substitui a sequência específica em um anticorpo, retém a ligação do dito anticorpo ao alvo e, de preferência, as funções do dito anticorpo como aqui descrito, por exemplo, lise mediada por CDC ou lise mediada por ADCC.

20 Será percebido pelas pessoas versadas na técnica que, em particular, as sequências de CDR, regiões hipervariáveis e variáveis podem ser modificadas sem perder a capacidade de se ligar a um alvo. Por exemplo, regiões CDR serão tanto idênticas ou altamente homólogas às regiões dos anticorpos

aqui especificados. Por "altamente homólogo" se entende que de 1 a 5, de preferência de 1 a 4, tal como de 1 a 3 ou 1 ou 2 substituições podem ser feitas nas CDRs. Além disso, as regiões hipervariáveis e variáveis podem ser modificadas de modo a que elas apresentem homologia substancial com as regiões de anticorpos especificamente reveladas no presente documento.

É para ser entendido que os ácidos nucleicos específicos aqui descritos também incluem ácidos nucleicos modificados por uma questão de otimização da utilização de códons em uma célula hospedeira ou organismo particular. As diferenças na utilização de códons entre os organismos pode levar a uma variedade de problemas envolvendo a expressão de gene heterólogo. A otimização de códon por alteração de um ou mais nucleotídeos da sequência original pode resultar em uma otimização da expressão de um ácido nucleico, em particular na otimização da eficácia de tradução, em um hospedeiro homólogo ou heterólogo em que o dito ácido nucleico deva ser expresso.

De acordo com a invenção, uma variante, derivado, forma modificada ou fragmento de uma sequência de ácido nucleico, sequência de aminoácidos, ou peptídeo de preferência tem uma propriedade funcional da sequência de ácidos nucleicos, sequência de aminoácidos ou peptídeo,

respectivamente, a partir do qual ela foi derivada. Tais propriedades funcionais compreendem a interação com ou ligação a outras moléculas. Em uma modalidade, uma variante, derivado, forma modificada ou fragmento de uma  
5 sequência de ácido nucleico, sequência de aminoácidos ou peptídeo é imunologicamente equivalente à sequência de ácido nucleico, sequência de aminoácidos ou peptídeo, respectivamente, a partir do qual ela foi derivada.

De preferência, o grau de identidade entre uma  
10 sequência de ácido nucleico específica e uma sequência de ácido nucleico que é modificada com relação a ou que é uma variante da dita sequência de ácido nucleico específica será de pelo menos 70%, de preferência pelo menos 75%, mais preferivelmente de pelo menos 80%, ainda mais  
15 preferivelmente de pelo menos 90% ou mais preferivelmente pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Em relação às variantes de ácido nucleico CLDN6, o grau de identidade é, de preferência, dado para uma região de pelo menos cerca de 300, pelo menos cerca de 400, pelo menos cerca de 450, pelo  
20 menos cerca de 500, pelo menos cerca de 550, pelo menos cerca de 600 ou pelo menos cerca 630 nucleotídeos. Em modalidades preferidas, o grau de identidade é dado para todo o comprimento da sequência de ácidos nucleicos de referência, tais como as sequências de ácido nucleico dadas

..

..

na listagem de sequências. De preferência, as duas sequências são capazes de hibridizar e formar uma dúplex estável uma com a outra, com a hibridização preferencialmente sendo realizada sob condições que permitem a hibridização específica entre os polinucleotídeos (condições estridentes). Condições estridentes são descritas, por exemplo, em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook e col., Editors, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989 ou Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel e col., Editors, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque e se referem, por exemplo, à hibridização a 65°C em tampão de hibridização (3,5 x SSC, Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02%, albumina de soro bovino 0,02%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM (pH 7), SDS 0,5%, EDTA 2 mM). SSC é cloreto de sódio 0,15 M/citrato de sódio 0,15 M, pH 7. Após a hibridização, a membrana a qual o DNA foi transferido é lavada, por exemplo, em 2 x SSC em temperatura ambiente e, em seguida, 0,1 a 0,5 x SSC/0,1 x SDS em temperaturas de até 68°C.

O termo "variante" de acordo com a invenção também inclui mutantes, variantes de união, conformações, isoformas, variantes alélicas, variantes de espécies e homólogos de espécies, em particular aqueles que são

naturalmente presentes. Uma variante alélica se refere a uma alteração na sequência normal de um gene, cujo significado é muitas vezes pouco claro. O sequenciamento genético completo frequentemente identifica numerosas  
5 variantes alélicas para um determinado gene. Um homólogo de espécie é uma sequência de ácido nucleico ou de aminoácidos com uma diferente espécie de origem daquela de uma dada sequência de ácidos nucleicos ou de aminoácidos.

Para as finalidades da presente invenção, "variantes"  
10 de uma sequência de aminoácidos compreende variantes de inserção de aminoácidos, variantes de adição de aminoácidos, variantes de eliminação de aminoácidos e/ou variantes de substituição de aminoácidos. Variantes de eliminação de aminoácidos que compreendem a eliminação na  
15 extremidade N-terminal e/ou C-terminal da proteína são também chamadas de variantes de truncagem N-terminal e/ou C-terminal.

Variantes de inserção de aminoácidos compreendem inserções de um ou dois ou mais aminoácidos em uma  
20 sequência de aminoácidos particular. No caso de variantes da sequência de aminoácidos possuindo uma inserção, um ou mais resíduos de aminoácidos são inseridos em um sítio particular em uma sequência de aminoácidos, embora a inserção aleatória com varredura apropriada do produto

resultante também seja possível.

Variantes de adição de aminoácidos compreendem fusões amino e/ou carbóxi terminais de um ou mais aminoácidos, tais como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos.

5       Variantes de eliminação de aminoácidos são caracterizadas pela remoção de um ou mais aminoácidos da sequência, tais como por remoção de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 ou mais aminoácidos. As eliminações podem ser em qualquer posição da proteína.

10       Variantes de substituição de aminoácidos são caracterizadas por pelo menos um resíduo na sequência sendo removido e outro resíduo sendo inserido no seu lugar. É dada preferência às modificações nas posições na sequência de aminoácidos que não são conservados entre as proteínas  
15       ou peptídeos homólogas e/ou a substituição de aminoácidos com outros tendo propriedades semelhantes. Preferivelmente, as mudanças de aminoácidos nas variantes de proteína são mudanças de aminoácidos conservadoras, isto é, substituições de aminoácido semelhantemente carregados ou  
20       não carregados. Uma modificação de aminoácidos conservadora envolve a substituição de um de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Aminoácidos de ocorrência natural são geralmente divididos em quatro famílias: aminoácidos ácidos (aspartato,



glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), apolares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), e polares descarregados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptofano e tirosina são algumas vezes classificados em conjunto como aminoácidos aromáticos.

De preferência, o grau de similaridade, de preferência de identidade entre uma sequência de aminoácidos específica e uma sequência de aminoácidos que é modificada com relação a ou que é uma variante da dita sequência de aminoácidos específica, tal como entre as sequências de aminoácidos apresentando homologia substancial, será de pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% ou mais preferivelmente pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. O grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para uma região de aminoácidos que é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% de todo o comprimento da sequência de aminoácido de referência. Por exemplo, se a sequência de aminoácido de referência consiste em 200 aminoácidos, o

grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 40, pelo menos cerca de 60, pelo menos cerca de 80, pelo menos cerca de 100, pelo menos cerca de 120, pelo menos cerca de 140, 5 pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180 ou cerca de 200 aminoácidos, de preferência aminoácidos contínuos. No que diz respeito às variantes de polipeptídeo CLDN6, o grau de similaridade ou identidade é dado preferivelmente para uma região de pelo menos cerca de 100, pelo menos 10 cerca de 120, pelo menos cerca de 140, pelo menos cerca de 160, pelo menos cerca de 180, pelo menos cerca de 200 ou pelo menos cerca de 210 aminoácidos. Em modalidades preferidas, o grau de similaridade ou identidade é dado para todo o comprimento da sequência de aminoácidos de 15 referência, tais como as sequências de aminoácidos dadas na listagem de sequências. O alinhamento para a determinação da similaridade de sequência, de preferência a identidade de sequência, pode ser feito com as ferramentas conhecidas na técnica, de preferência usando o melhor alinhamento de 20 sequência, por exemplo, usando Align, usando as configurações padrão, de preferência EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10,0, Gap Extend 0,5.

"Similaridade de sequência" indica a porcentagem de aminoácidos que tanto são idênticos ou que representam

substituições de aminoácidos conservadoras. "Identidade de sequência" entre duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos indica a porcentagem de aminoácidos ou nucleotídeos que são idênticos entre as sequências.

5       A "identidade percentual" é obtida após o melhor alinhamento, sendo esta porcentagem puramente estatística e as diferenças entre as duas sequências sendo distribuídas de forma aleatória e em todos os seus comprimentos. As comparações de sequências entre duas sequências de  
10       nucleotídeos ou aminoácidos são convencionalmente realizadas mediante a comparação dessas sequências, depois de tê-las alinhado da melhor maneira, a dita comparação sendo realizada por segmento ou por "janela de comparação" a fim de identificar e comparar regiões locais de  
15       similaridade de sequência. O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser produzido, além de manualmente, por meio do algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por meio do algoritmo de homologia local de Neddleman e Wunsch, 1970,  
20       *J. Mol. Biol.* 48, 443, por meio do método de busca de similaridade de Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444, ou por meio de programas de computador que utilizam estes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA no Pacote de Software de Wisconsin

Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

A identidade percentual é calculada por determinação do número de posições idênticas entre as duas sequências sendo comparadas, dividindo este número pelo número de posições comparadas e multiplicando o resultado obtido por 100, de modo a obter a identidade percentual entre estas duas sequências.

"Substituições conservadoras" podem ser feitas, por exemplo, com base de semelhança em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliicidade e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo: (a) aminoácidos apolares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina; (b) aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; (c) aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina e histidina; e (d) aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem o ácido aspártico e ácido glutâmico. As substituições podem, tipicamente, ser feitas dentro dos grupos (a)-(d). Além disso, glicina e prolina podem ser substituídas uma pela outra com base na sua capacidade para romper as  $\alpha$ -hélices. Algumas substituições preferidas podem ser feitas

entre os seguintes grupos: (i) S e T; (ii) P e G; e (iii) A, V, L e I. Dado o código genético conhecido, e técnicas de DNA recombinante e sintético, o cientista versado na técnica pode prontamente construir DNAs que codificam as  
5 variantes conservadoras de aminoácidos.

A presente invenção compreende anticorpos em que as alterações foram feitas na região Fc a fim de alterar as propriedades funcionais ou farmacocinéticas dos anticorpos. Tais alterações podem resultar em uma diminuição ou aumento  
10 da ligação Clq e CDC ou a ligação de FcγR e ADCC. As substituições podem, por exemplo, ser feitas em um ou mais dos resíduos de aminoácidos da região constante da cadeia pesada, causando assim uma alteração em uma função efetora, retendo ao mesmo tempo a capacidade de se ligar ao  
15 antígeno, em comparação com o anticorpo modificado, cf. US 5,624,821 e US 5,648,260.

A meia-vida *in vivo* dos anticorpos pode ser melhorada através da modificação do epítipo do receptor de recuperação do domínio constante de Ig ou um domínio  
20 constante *Ig-like*, de modo que a molécula não compreenda um domínio CH<sub>2</sub> intacto ou uma região Fc de Ig intacta, cf. US 6,121,022 e US 6,194,551. A meia-vida *in vivo* pode, além disso, ser aumentada através de mutações na região Fc, por exemplo, por substituição de treonina por leucina na

posição 252, por substituição de treonina por serina na  
posição 254, ou por substituição de treonina por  
fenilalanina na posição 256, cf. US 6,277,375.

Além disso, o padrão de glicosilação dos anticorpos  
5 pode ser modificado a fim de alterar a função efetora dos  
anticorpos. Por exemplo, os anticorpos podem ser expressos  
em um transfectoma, que não adiciona a unidade de fucose  
normalmente ligada à Asn na posição 297 da região Fc de  
modo a aumentar a afinidade da região Fc por receptores Fc  
10 que, por sua vez, irá resultar em uma ADCC aumentada dos  
anticorpos na presença de células NK, cf. Shield e col.  
(2002) JBC, 277: 26733. Além disso, a modificação da  
galactosilação pode ser feita de modo a modificar CDC.

Alternativamente, em outra modalidade, as mutações  
15 podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou  
parte de uma sequência codificadora de anticorpos anti-  
CLDN6, tal como por mutagênese de saturação, e os  
anticorpos anti-CLDN6 modificados resultantes podem ser  
testados quanto à atividade de ligação.

20 De acordo com a invenção, o termo "célula" ou "célula  
hospedeira" de preferência se refere a uma célula intacta,  
isto é, uma célula com uma membrana intacta que não tenha  
liberado os seus componentes intracelulares normais, tais  
como enzimas, organelas ou material genético. Uma célula

intacta é de preferência uma célula viável, isto é, uma célula viva capaz de realizar as suas funções metabólicas normais. Preferivelmente, o dito termo se refere, de acordo com a invenção, a qualquer célula que pode ser transformada ou transfectada com um ácido nucleico exógeno. O termo "célula" inclui, de acordo com a invenção, células procarióticas (por exemplo, *E. coli*) ou células eucarióticas (por exemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células HEK293, células HELA, células de levedura e células de inseto). O ácido nucleico exógeno pode ser encontrado dentro da célula (i) livremente disperso como tal, (ii) incorporado em um vetor recombinante ou (iii) integrado no genoma da célula hospedeira ou no DNA mitocondrial. As células de mamíferos são particularmente preferidas, tais como as células de seres humanos, camundongos, hamsters, porcos, cabras e primatas. As células podem ser derivadas de um grande número de tipos de tecidos e incluem células primárias e linhagens celulares. Exemplos específicos incluem queratinócitos, leucócitos do sangue periférico, células-tronco da medula óssea e células-tronco embrionárias. Em modalidades adicionais, a célula é uma célula apresentadora de antígeno, em particular uma célula dendrítica, um monócito ou macrófago. O termo "célula hospedeira", tal

como aqui utilizado, de preferência é tencionado a se referir a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido.

Uma célula que compreende uma molécula de ácido nucleico de preferência expressa o peptídeo ou proteína codificados pelo ácido nucleico.

O termo "animal transgênico" se refere a um animal tendo um genoma que compreende um ou mais transgenes, de preferência transgenes de cadeia pesada e/ou leve, ou transcromossomos (integrados ou não integrados ao DNA genômico natural do animal), e que é de preferência capaz de expressar os transgenes. Por exemplo, um camundongo transgênico pode ter um transgene de cadeia leve humano e tanto um transgene de cadeia pesada humano ou um transcromossomo de cadeia pesada humano, de tal modo que o camundongo produza anticorpos anti-CLDN6 humanos quando imunizado com o antígeno CLDN6 e/ou células expressando CLDN6. O transgene da cadeia pesada humano pode ser integrado no DNA cromossomal do camundongo, como é o caso para camundongos transgênicos, por exemplo, camundongos HuMAb, tais como camundongos HCo7 ou HCo12, ou o transgene da cadeia pesada humano pode ser mantido extracromossomicamente, como é o caso dos camundongos transcromossômicos (por exemplo, KM) como descrito em WO



02/43478. Tais camundongos transgênicos e transcromossomais podem ser capazes de produzir isotipos múltiplos de anticorpos monoclonais humanos para CLDN6 (por exemplo, IgG, IgA e/ou IgE) submetendo-se à recombinação V-D-J e  
5 comutação de isotipo.

"Reduzir" ou "inibir", tal como aqui utilizado, significa a capacidade de causar uma diminuição global, de preferivelmente de 5% ou mais, 10% ou mais, 20% ou mais, mais preferivelmente de 50% ou mais, e mais preferivelmente  
10 de 75% ou mais, no nível, por exemplo, no nível de proliferação das células. O termo "inibir" ou frases similares incluem uma inibição completa ou essencialmente completa, isto é, uma redução a zero ou essencialmente a zero.

15 Termos tais como "aumentando" ou "intensificando" preferivelmente dizem respeito a um aumento ou melhoria por cerca de pelo menos 10%, de preferência pelo menos 20%, de preferência pelo menos 30%, mais preferivelmente pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, ainda mais  
20 preferivelmente pelo menos 80% e mais preferivelmente pelo menos 100%. Estes termos também podem se referir às circunstâncias, em que no tempo zero não existe um sinal detectável para um certo composto ou condição e num intervalo particular além do tempo zero, há um sinal

detectável para um determinado composto ou condição.

O termo "imunologicamente equivalente" significa que a molécula imunologicamente equivalente, tal como a sequência de aminoácidos imunologicamente equivalente, exibe propriedades imunológicas iguais ou essencialmente iguais e/ou exerce efeitos imunológicos iguais ou essencialmente iguais, por exemplo, no que diz respeito ao tipo de efeito imunológico, tal como a indução de uma resposta imune humoral e/ou celular, a força e/ou duração da reação imune induzida ou a especificidade da reação imune induzida. No contexto da presente invenção, o termo "imunologicamente equivalente" é usado de preferência em relação aos efeitos ou propriedades imunológicos de um peptídeo ou variante de peptídeo utilizado para a imunização. Uma propriedade imunológica particular é a capacidade de se ligar aos anticorpos e, quando apropriado, gerar uma resposta imune, de preferência por estimulação da geração de anticorpos. Por exemplo, uma sequência de aminoácidos é imunologicamente equivalente a uma sequência de aminoácidos de referência, se a dita sequência de aminoácidos, quando exposta ao sistema imune de um indivíduo, induz uma reação imune, de preferência anticorpos, tendo uma especificidade de reação com a sequência de aminoácido de referência, tal como a sequência de aminoácidos de referência que faz parte

da CLDN6.

O termo "funções imunes efetoras", no contexto da presente invenção, inclui quaisquer funções mediadas por componentes do sistema imune que resultam na inibição do crescimento tumoral e/ou inibição do desenvolvimento tumoral, incluindo a inibição da disseminação e metástase tumoral. De preferência, as funções imunes efetoras resultam na morte das células tumorais. De preferência, as funções imunes efetoras no contexto da presente invenção são funções efetoras mediadas por anticorpos. Tais funções compreendem a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), a citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), a indução da apoptose nas células que transportam o antígeno associado ao tumor, por exemplo, por ligação do anticorpo a um antígeno de superfície e/ou inibição da proliferação das células que transportam o antígeno associado ao tumor, de preferência ADCC e/ou CDC. Assim, os anticorpos que são capazes de mediar uma ou mais funções imunes efetoras são, de preferência, capazes de mediar a morte de células por indução da lise mediada por CDC, lise mediada por ADCC, apoptose, adesão homotípica e/ou fagocitose, de preferência através da indução da lise mediada por CDC e/ou da lise mediada por ADCC. Os anticorpos podem também exercer um efeito simplesmente pela

ligação a antígenos associados a tumor na superfície de uma célula tumoral. Por exemplo, os anticorpos podem bloquear a função do antígeno associado ao tumor ou induzir a apoptose apenas pela ligação ao antígeno associado ao tumor na  
5 superfície de uma célula tumoral.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

#### **Mecanismos de ação do mAb.**

Embora a descrição a seguir forneça considerações sobre o mecanismo subjacente à eficácia terapêutica dos anticorpos da invenção, isto não deve ser considerado como  
10 limitante da invenção sob qualquer aspecto.

Os anticorpos aqui descritos podem interagir com os componentes do sistema imune, de preferência através de ADCC ou CDC. Os anticorpos da invenção podem também ser  
15 utilizados em cargas alvo (por exemplo, radioisótopos, fármacos ou toxinas) para matar diretamente as células tumorais ou podem ser usados sinergicamente com agentes quimioterápicos tradicionais, atacando tumores por meio de mecanismos de ação complementares que podem incluir  
20 respostas imunes antitumorais, que podem ter sido comprometidas devido aos efeitos colaterais citotóxicos dos quimioterápicos sobre os linfócitos T. No entanto, os anticorpos da invenção podem também exercer um efeito simplesmente pela ligação à CLDN6 na superfície celular,

assim, por exemplo, bloqueando a proliferação das células.

**Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo.**

ADCC descreve a capacidade de morte celular das  
5 células efetoras, tal como descrito no presente documento,  
particularmente linfócitos, que preferivelmente requer que  
a célula alvo seja marcada por um anticorpo.

ADCC, de preferência, ocorre quando os anticorpos se  
ligam aos antígenos nas células tumorais e os domínios Fc  
10 do anticorpo se ligam aos receptores Fc (FcR) sobre a  
superfície de células imunes efetoras. Várias famílias de  
receptores Fc foram identificadas, e as populações de  
células específicas expressam caracteristicamente  
receptores Fc definidos. ADCC pode ser visto como um  
15 mecanismo para induzir diretamente um grau variável de  
destruição imediata do tumor, que leva à apresentação do  
antígeno e à indução de respostas de células T direcionadas  
a tumor. De preferência, a indução de ADCC *in vivo* levará  
às respostas de células T direcionadas ao tumor e às  
20 respostas de anticorpo derivadas do hospedeiro.

**Citotoxicidade dependente do complemento.**

CDC é outro método de morte celular que pode ser  
direcionado por anticorpos. IgM é o isotipo mais eficaz  
para ativação do complemento. IgG1 e IgG3 são também muito

eficazes no direcionamento de CDC através da via de ativação do complemento clássica. Preferivelmente, nesta cascata, a formação de complexos antígeno-anticorpo resulta na exposição de múltiplos sítios de ligação de Clq em estreita proximidade com os domínios C<sub>H</sub>2 de moléculas de anticorpo participantes, como moléculas de IgG (Clq é um dos três subcomponentes do complemento C1). De preferência, estes sítios de ligação de Clq expostos convertem a interação Clq-IgG anteriormente de baixa afinidade em uma de elevada avides, o que desencadeia uma cascata de eventos que envolve uma série de outras proteínas do complemento e leva à liberação proteolítica dos agentes quimiotáticos/de ativação de células efetoras C3a e C5a. De preferência, a cascata do complemento termina na formação de um complexo de ataque à membrana, que cria poros na membrana celular de modo a facilitar a livre passagem de água e solutos para dentro e para fora da célula.

#### **Produção de anticorpos.**

Os anticorpos da invenção podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo a metodologia do anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein, Nature 256: 495 (1975). Embora os procedimentos de hibridização de células somáticas sejam preferidos, a

princípio, outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais podem ser empregadas, por exemplo, a transformação viral ou oncogênica dos linfócitos B ou técnicas de exibição de fagos utilizando bibliotecas de genes de anticorpo.

O sistema animal preferido para a preparação de hibridomas que secretam anticorpos monoclonais é o sistema murino. A produção de hibridoma no camundongo é um procedimento muito bem estabelecido. Protocolos de imunização e técnicas para o isolamento de esplenócitos imunizados para a fusão são conhecidos na técnica. Parceiros de fusão (por exemplo, células de mieloma de murino) e procedimentos de fusão são também conhecidos.

Outros sistemas animais preferidos para a preparação de hibridomas que secretam anticorpos monoclonais são os sistemas de rato e de coelho (por exemplo, descritos em Spieker-Polet e col., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 92:9348 (1995), ver também Rossi e col., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Em ainda outra modalidade preferida, anticorpos monoclonais humanos direcionados contra CLDN6 podem ser gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossomais que transportam partes do sistema imune humano em vez do sistema de camundongo. Esses camundongos

transgênicos e transcromossomais incluem camundongos, conhecidos como camundongos HuMAb e camundongos KM, respectivamente, e são coletivamente mencionados aqui como "camundongos transgênicos". A produção de anticorpos humanos em tais camundongos transgênicos pode ser realizada como descrito em detalhes para CD20 em WO2004 035607.

Ainda outra estratégia para a geração de anticorpos monoclonais é isolar diretamente os genes que codificam anticorpos a partir de linfócitos produtores de anticorpos da estratégia definida, ver, por exemplo, Babcock e col., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Para detalhes de engenharia de anticorpos recombinantes, ver também Welschof e Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 e Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

#### **Imunizações.**

Para gerar anticorpos para CLDN6, os camundongos podem ser imunizados com peptídeos conjugados com transportador derivados da sequência de CLDN6, uma preparação enriquecida de antígeno CLDN6 recombinantemente expresso ou seus fragmentos e/ou células que expressam CLDN6 ou seus fragmentos, como descrito. Alternativamente, os camundongos podem ser imunizados com DNA que codifica CLDN6 humana de



comprimento total ou fragmentos seus. No caso em que as imunizações utilizando uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno CLDN6 não resultam em anticorpos, os camundongos também podem ser imunizados com células que expressam CLDN6, por exemplo, uma linhagem celular, para promover respostas imunes.

A resposta imune pode ser monitorada ao longo do curso do protocolo de imunização com amostras de plasma e de soro sendo obtidas por sangramento retrorbital ou da veia da cauda. Os camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina anti-CLDN6 podem ser usados para fusões. Os camundongos podem ser reforçados por via intraperitoneal ou intravenosa com células expressando CLDN6 3 a 5 dias antes do sacrifício e remoção do baço para aumentar a taxa de hibridomas secretores de anticorpos específicos.

#### **Geração de Hibridomas Produtores de Anticorpos Monoclonais.**

Para gerar hibridomas produtores de anticorpos monoclonais para CLDN6, células dos linfonodos ou baços obtidas a partir de camundongos imunizados podem ser isoladas e fundidas a uma linhagem apropriada de células imortalizadas, tal como uma linhagem de células de mieloma de camundongos. Os hibridomas resultantes podem então ser testados quanto à produção de anticorpos antígeno

específicos. Poços individuais podem então ser testados por ELISA para os hibridomas secretores de anticorpos. Por análise de imunofluorescência e FACS usando células que expressam CLDN6, anticorpos com especificidade para CLDN6  
5 podem ser identificados. Os hibridomas secretores de anticorpos podem ser replaqueados, novamente testados e, se ainda forem positivos para anticorpos monoclonais anti-CLDN6, podem ser subclonados por diluição limitante. Os subclones estáveis podem então ser cultivados *in vitro* para  
10 gerar anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

#### **Geração de Transfectomas Produtores de Anticorpos Monoclonais.**

Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos  
15 em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de genes, como são bem conhecidos na técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por exemplo, em uma modalidade, o(s) gene(s) de  
20 interesse, por exemplo, genes de anticorpos, podem ser ligados em um vetor de expressão, tal como um plasmídeo de expressão eucariótica, como utilizado pelo sistema de expressão de genes GS divulgado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338841, ou outros sistemas de expressão bem conhecidos

na técnica. O plasmídeo purificado com os genes de anticorpo clonados pode ser introduzido em células hospedeiras eucarióticas, tais como células CHO, células NS/O, células HEK293T ou células HEK293 ou, 5 alternativamente, outras células eucarióticas, como as células derivadas de plantas, fungos ou células de leveduras. Os métodos usados para introduzir estes genes podem ser métodos descritos na técnica, tais como eletroporação, lipofectina, lipofectamina ou outros. Após a 10 introdução destes genes de anticorpos nas células hospedeiras, células que expressam o anticorpo podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem então ser amplificados para o seu nível de expressão e ter a escala aumentada para produzir 15 anticorpos. Os anticorpos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir destes sobrenadantes de cultura e/ou células.

Alternativamente, os genes de anticorpos clonados podem ser expressos em outros sistemas de expressão, 20 incluindo células procarióticas, tais como microrganismos, por exemplo, *E. coli*. Além disso, os anticorpos podem ser produzidos em animais não humanos transgênicos, tais como no leite de ovelha e coelhos ou em ovos de galinhas ou em plantas transgênicas; ver, por exemplo, Verma, R., e col.

(1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, e col.  
(1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; e Fischer, R., e  
col. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

#### **Uso de Sequências de Anticorpo Parciais para Expressar**

##### **5 Anticorpos Intactos (isto e, humanização e quimerização).**

###### **a) Quimerização**

Anticorpos monoclonais de murinos podem ser usados  
como anticorpos terapêuticos em seres humanos, quando  
marcados com toxinas ou isótopos radioativos. Anticorpos de  
10 murinos não marcados são altamente imunogênicos no homem  
quando aplicados repetidamente, levando à redução do efeito  
terapêutico. A imunogenicidade principal é mediada pelas  
regiões constantes da cadeia pesada. A imunogenicidade de  
anticorpos murinos no homem pode ser reduzida ou  
15 completamente evitada se os anticorpos correspondentes  
forem quimerizados ou humanizados. Os anticorpos quiméricos  
são anticorpos, as porções diferentes dos quais sendo  
derivadas de diferentes espécies animais, tais como aquelas  
que têm uma região variável derivada de um anticorpo de  
20 murino e uma região constante de imunoglobulina humana. A  
quimerização dos anticorpos é conseguida através da junção  
das regiões variáveis da cadeia pesada e leve de anticorpo  
de murino com a região constante de cadeia pesada e leve  
humana (por exemplo, como descrito por Kraus e col., em

Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8). Em uma modalidade preferida, os anticorpos quiméricos são gerados pela união da região constante da cadeia leve capa humana com a região variável da cadeia leve de murino. Em uma modalidade também preferida, os anticorpos quiméricos podem ser gerados pela união da região constante da cadeia leve lambda humana com a região variável da cadeia leve de murino. As regiões constantes da cadeia pesada preferidas para a geração de anticorpos quiméricos são IgG1, IgG3 e IgG4. Outras regiões constantes da cadeia pesada preferidas para a geração de anticorpos quiméricos são IgG2, IgA, IgD e IgM.

#### b) Humanização

Os anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada e leve (CDRs). Por esta razão, as sequências de aminoácidos nas CDRs são mais diversas entre os anticorpos individuais do que as sequências fora das CDRs. Uma vez que as sequências de CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que mimetizam as propriedades dos anticorpos de ocorrência natural específicos pela construção de vetores de expressão

que incluem sequências de CDR do anticorpo de ocorrência natural específico enxertadas nas sequências estruturais a partir de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (ver, por exemplo, Riechmann, L. e col. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. e col. (1986) Nature 321: 522-525; e Queen, C. e col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86: 10029-10033). Tais sequências de estrutura podem ser obtidas a partir de bancos de dados de DNA públicos, que incluem sequências de genes de anticorpos de linhagem germinativa. Estas sequências de linhagem germinativa irão diferir das sequências de genes de anticorpos maduros porque elas não incluirão genes variáveis completamente montados, que são formados por união V(D)J durante a maturação das células B. Sequências de genes da linhagem germinativa irão também diferir das sequências de um anticorpo de repertório secundário de alta afinidade no indivíduo uniformemente através da região variável. Por exemplo, as mutações somáticas são relativamente pouco frequentes na porção aminoterminal da região de estrutura 1 e na porção carboxiterminal da região de estrutura 4. Além disso, muitas mutações somáticas não alteram significativamente as propriedades de ligação do anticorpo. Por esta razão, não é necessário obter a sequência completa de DNA de um anticorpo particular a fim de recriar um

anticorpo recombinante intacto tendo propriedades de ligação semelhantes às das do anticorpo original (ver WO 99/45962). Sequências parciais de cadeia pesada e leve que englobam as regiões CDR são tipicamente suficientes para esta finalidade. A sequência parcial é usada para determinar qual variável da linhagem germinativa e segmentos do gene de união contribuíram para os genes variáveis de anticorpo recombinados. A sequência da linhagem germinativa é então utilizada para encher as porções que faltam das regiões variáveis. Sequências líder de cadeia pesada e leve são clivadas durante a maturação da proteína e não contribuem para as propriedades do anticorpo final. Para adicionar sequências que faltam, sequências de cDNA clonadas podem ser combinadas com oligonucleotídeos sintéticos por ligação ou amplificação por PCR. Alternativamente, toda a região variável pode ser sintetizada como um conjunto de oligonucleotídeos curtos, sobreponíveis e combinados através de amplificação por PCR para criar um clone da região variável totalmente sintético. Este processo tem certas vantagens, como a eliminação ou inclusão ou sítios de restrição particulares, ou otimização de códons particulares.

As sequências de nucleotídeos dos transcritos de cadeia pesada e leve a partir de hibridomas são utilizadas

para conceber um conjunto de sobreposição de oligonucleotídeos sintéticos para criar sequências V sintéticas com capacidades de codificação de aminoácidos idênticas às sequências naturais. As sequências de cadeia pesada e capa sintéticas podem diferir das sequências naturais de três formas: fitas de bases de nucleotídeo repetidas são interrompidas para facilitar a síntese de oligonucleotídeos e amplificação por PCR; sítios de iniciação de tradução ótimos são incorporados de acordo com as regras de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); e sítios HindIII são concebidos à montante dos sítios de iniciação de tradução.

Para ambas as regiões variáveis de cadeia pesada e leve, as sequências de fita codificantes otimizadas e as não codificantes correspondentes são quebradas em 30 a 50 nucleotídeos aproximadamente no ponto médio do oligonucleotídeo não codificante correspondente. Assim, para cada cadeia, os oligonucleotídeos podem ser montados em grupos de dupla fita que se sobrepõem e se estendem por segmentos de 150 a 400 nucleotídeos. Os agrupamentos são então usados como moldes para a produção de produtos de amplificação por PCR de 150 a 400 nucleotídeos. Tipicamente, um conjunto de oligonucleotídeos da região variável única será quebrado em dois agrupamentos, que são



amplificados separadamente para gerar dois produtos de PCR que se sobrepõem. Estes produtos sobrepostos são então combinados através de amplificação por PCR para formar a região variável completa. Também pode ser desejável incluir  
5 um fragmento de sobreposição da região constante da cadeia pesada ou leve na amplificação por PCR para gerar fragmentos que podem ser facilmente clonado nos constructos do vetor de expressão.

As regiões variáveis de cadeia pesada e leve  
10 quimerizadas ou humanizadas reconstruídas são, então, combinadas com as sequências de promotor, líder, de início de tradução, região constante, 3' não traduzida, de poliadenilação e de terminação de transcrição clonadas para formar constructos de vetor de expressão. Os constructos de  
15 expressão de cadeia pesada e leve podem ser combinados em um único vetor, cotransfectados, transfectados em série ou transfectados separadamente em células hospedeiras que são, então, fundidas para formar uma célula hospedeira expressando ambas as cadeias. Os plasmídeos para uso na  
20 construção de vetores de expressão para IgGκ humanos são descritos. Os plasmídeos podem ser construídos de modo que as sequências de cDNA de cadeia V capa leve e V pesada amplificadas por PCR possam ser usadas para reconstruir minigenes completos de cadeia pesada e leve. Estes

plasmídeos podem ser usados para expressar anticorpos IgG1, Capa ou IgG4, Capa completamente humanos ou quiméricos. Plasmídeos similares podem ser construídos para a expressão de outros isotipos de cadeia pesada, ou para a expressão de anticorpos que compreendem cadeias leves lambda.

Assim, em outro aspecto da invenção, as características estruturais dos anticorpos anti-CLDN6 da invenção são usadas para criar anticorpos anti-CLDN6 humanizados estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como ligação à CLDN6. Mais especificamente, uma ou mais regiões de CDR de anticorpos monoclonais de camundongo podem ser combinadas recombinantemente com regiões de estrutura humanas conhecidas e CDRs para criar outros anticorpos anti-CLDN6 humanizados, recombinantemente manipulados da invenção.

#### **Ligação às células que expressam antígenos.**

A capacidade do anticorpo de se ligar à CLDN6 pode ser determinada utilizando ensaios de ligação padrão, tais como aqueles estabelecidos nos exemplos (por exemplo, ELISA, Western Blot, Imunofluorescência e Análise por Citometria de Fluxo).

#### **Isolamento e caracterização de anticorpos.**

Para purificar os anticorpos anti-CLDN6, hibridomas

selecionados podem ser cultivados em frascos giratórios de dois litros para a purificação de anticorpo monoclonal. Alternativamente, os anticorpos anti-CLDN6 podem ser produzidos em biorreatores à base de diálise. Os sobrenadantes podem ser filtrados e, caso necessário, concentrados antes da cromatografia por afinidade com proteína G-Sepharose ou proteína A-sepharose. IgG eluída pode ser verificada por eletroforese em gel e cromatografia líquida de alta eficiência para assegurar a pureza. A solução tampão pode ser trocada em PBS, e a concentração pode ser determinada por OD280 usando o coeficiente de extinção de 1,43. Os anticorpos monoclonais podem ser aliquotados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-CLDN6 selecionados se ligam a epítomos únicos, mutagênese sítio-dirigida ou multi sítio-dirigida podem ser usadas.

#### **Determinação do isotipo.**

Para determinar o isotipo dos anticorpos purificados, ELISAs de isotipo com vários kits comerciais (por exemplo, Zymed, Roche Diagnostics) podem ser realizados. Os poços de placas de microtitulação podem ser revestidos com Ig anti-camundongo. Após o bloqueio, as placas reagem com anticorpos monoclonais ou controles de isotipo purificados, em temperatura ambiente durante duas horas. Os poços podem

então reagir com IgG1, IgG2a, IgG2b ou IgG3, IgA de camundongo, ou sondas conjugadas com a peroxidase específica para IgM de camundongo. Após a lavagem, as placas podem ser desenvolvidas com o substrato ABTS (1 mg/ml) e analisadas em OD de 405-650. Alternativamente, o kit de isotipagem de anticorpo monoclonal de camundongo IsoStrip (Roche, No. Cat. 1493027) pode ser utilizado como descrito pelo fabricante.

#### **Análise por citometria de fluxo.**

10 A fim de demonstrar a presença de anticorpos anti-CLDN6 nos soros de camundongos imunizados ou a ligação de anticorpos monoclonais às células vivas que expressam CLDN6, citometria de fluxo pode ser usada. As linhagens celulares que expressam CLDN6 naturalmente ou após a transfecção e controles negativos sem a expressão de CLDN6  
15 (cultivados sob condições de crescimento padrão) podem ser misturadas com várias concentrações de anticorpos monoclonais em sobrenadantes de hibridoma ou em PBS contendo 1% de FBS, e podem ser incubadas a 4°C durante 30  
20 min. Após a lavagem, o anticorpo anti-IgG marcado com APC ou Alexa647 pode se ligar ao anticorpo monoclonal ligado à CLDN6 sob as mesmas condições que a marcação com anticorpo primário. As amostras podem ser analisadas por citometria de fluxo com um instrumento FACS usando propriedades de

espalhamento lateral e luz para penetrar em células vivas individuais. A fim de distinguir anticorpos monoclonais específicos para CLDN6 de ligantes não específicos em uma única medição, o método de cotransfecção pode ser utilizado. Células transfectadas transientemente com plasmídeos que codificam CLDN6 e um marcador fluorescente podem ser coradas como descrito acima. As células transfectadas podem ser detectadas em um canal de fluorescência diferente das células marcadas com anticorpo. Uma vez que a maioria das células transfectadas expressam ambos os transgenes, anticorpos monoclonais CLDN6 específicos se ligam preferivelmente às células que expressam marcadores de fluorescência, enquanto que anticorpos não específicos se ligam a uma razão comparável às células não transfectadas. Um ensaio alternativo utilizando microscopia de fluorescência pode ser utilizado além de ou em vez do ensaio de citometria de fluxo. As células podem ser coradas exatamente como descrito acima e examinadas por microscopia de fluorescência.

#### 20      **Microscopia de Imunofluorescência.**

A fim de demonstrar a presença de anticorpos anti-CLDN6 em soros de camundongos imunizados ou a ligação de anticorpos monoclonais em células vivas que expressam CLDN6, a análise de microscopia de imunofluorescência pode

ser usada. Por exemplo, linhagens celulares que expressam CLDN6 tanto espontaneamente como após a transfecção e controles negativos sem expressão de CLDN6 são cultivados em lâminas de câmara sob condições de crescimento padrão em meio DMEM/F12, suplementado com 10% de soro fetal de bezerro (FCS), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml. As células podem então ser fixadas com metanol ou paraformaldeído ou deixadas sem tratamento. As células podem então reagir com anticorpos monoclonais contra CLDN6 durante 30 min a 25°C. Após a lavagem, as células podem reagir com um anticorpo secundário IgG anticomundongo marcado com Alexa555 (Molecular Probes), sob as mesmas condições. As células podem então ser examinadas por microscopia de fluorescência.

Os níveis de CLDN6 total nas células podem ser observados quando as células são fixadas em metanol ou em paraformaldeído e permeabilizadas com Triton X-100. Em células vivas e não permeabilizadas, a localização de CLDN6 na superfície de células fixadas com paraformaldeído pode ser examinada. Além disso, o alvejamento de CLDN6 nas junções firmes pode ser analisado por co-coloração com marcadores de junção firme, como ZO-1. Além disso, os efeitos de ligação de anticorpo e localização de CLDN6 na

membrana celular podem ser examinados.

### **Western Blot.**

IgG anti-CLDN6 pode ser ainda testada quanto à reatividade com o antígeno CLDN6 por Western Blotting.

5 Resumidamente, extratos celulares de células que expressam CLDN6 e controles negativos adequados podem ser preparados e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS). Após a eletroforese, os antígenos separados serão transferidos para membranas de  
10 nitrocelulose, bloqueados e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação da IgG pode ser detectada utilizando IgG peroxidase anticamundongo e desenvolvida com o substrato ECL.

### **Imunoistoquímica.**

15 IgGs de camundongo anti-CLDN6 podem ser ainda testadas quanto à reatividade com o antígeno CLDN6 por Imunoistoquímica de uma maneira bem conhecida para a pessoa versada, por exemplo usando criossecções fixadas em paraformaldeído ou acetona ou seções de tecido embebidas em  
20 parafina fixadas com paraformaldeído a partir de tecido não canceroso ou amostras de tecido canceroso obtidas de pacientes durante procedimentos cirúrgicos de rotina ou a partir de camundongos portando tumores xenoenxertados inoculados com linhagens celulares que expressam CLDN6

espontaneamente ou após transfecção. Para imunocoloração, os anticorpos reativos para CLDN6 podem ser incubados seguido por anticorpos de cabra anticomundongo ou de cabra anticoelho (DAKO) conjugados com a peroxidase de rábano silvestre, de acordo com as instruções dos fornecedores.

#### **Atividades Fagocíticas e de Morte Celular de Anticorpos *in vitro*.**

Além de se ligarem especificamente à CLDN6, anticorpos anti-CLDN6 podem ser testados quanto às suas capacidades de mediar a fagocitose e morte de células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares. O teste de atividade do anticorpo monoclonal *in vitro* irá fornecer uma triagem inicial antes do teste em modelos *in vivo*.

#### **Citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC):**

Resumidamente, células polimorfonucleares (PMNs), células NK, monócitos, células mononucleares ou outras células efectoras de doadores saudáveis, podem ser purificados por centrifugação de densidade Ficoll Hypaque, seguido por lise de eritrócitos contaminantes. As células efectoras lavadas podem ser suspensas em RPMI suplementado com soro fetal de bezerro inativado pelo calor a 10% ou, alternativamente, com soro humano inativado pelo calor a 5%



e misturados com células alvo expressando CLDN6 marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, em várias taxas de células efetoras para células alvo. Alternativamente, as células alvo podem ser marcadas com um ligando intensificador de fluorescência (BATDA). Um quelato altamente fluorescente de Európio com o ligante intensificador, que é liberado de células mortas, pode ser medido por um fluorômetro. Outra técnica alternativa pode utilizar a transfecção de células alvo com luciferase. Amarelo lucifer adicionado pode ser, então, oxidado apenas por células viáveis. As IgGs anti-CLDN6 purificadas podem ser, então, adicionadas em várias concentrações. IgG humana irrelevante pode ser utilizada como controle negativo. Os ensaios podem ser realizados durante 4 a 20 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , dependendo do tipo de célula efetora utilizada. As amostras podem ser avaliadas para a citólise por medição de liberação de  $^{51}\text{Cr}$  ou a presença do quelato EuTDA no sobrenadante da cultura. Alternativamente, a luminescência resultante da oxidação de amarelo lúcido pode ser uma medida de células viáveis.

Anticorpos monoclonais anti-CLDN6 também podem ser testados em várias combinações para determinar se a citólise é aumentada com anticorpos monoclonais múltiplos.

*Citotoxicidade dependente do Complemento (CDC):*

Anticorpos monoclonais anti-CLDN6 podem ser testados quanto às suas capacidades de mediar CDC usando uma variedade de técnicas conhecidas. Por exemplo, o soro para complemento pode ser obtido a partir de sangue de uma  
5 maneira conhecida pela pessoa versada na técnica. Para determinar a atividade CDC de mAbs, diferentes métodos podem ser usados. A liberação de  $^{51}\text{Cr}$  pode, por exemplo, ser medida ou a elevada permeabilidade da membrana pode ser avaliada utilizando um ensaio de exclusão de iodeto de  
10 propídio (IP). Resumidamente, as células alvo podem ser lavadas e  $5 \times 10^5/\text{ml}$  podem ser incubadas com várias concentrações de mAb durante 10 a 30 min em temperatura ambiente ou a  $37^\circ\text{C}$ . O soro ou plasma pode, então, ser adicionado até uma concentração final de 20% (v/v) e as  
15 células incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 a 30 min. Todas as células de cada amostra podem ser adicionadas à solução IP em um tubo FACS. A mistura pode, então, ser analisada imediatamente por análise de citometria de fluxo utilizando FACSArray.

20 Em um ensaio alternativo, a indução de CDC pode ser determinada em células aderentes. Em uma modalidade deste ensaio, as células são semeadas 24 h antes do ensaio com uma densidade de  $3 \times 10^4/\text{poço}$  em placas de microtitulação de fundo chato de cultura de tecidos. No dia seguinte o

meio de crescimento é removido e as células são incubadas em triplicatas com anticorpos. As células de controle são incubadas com meio de crescimento ou meio de crescimento contendo saponina 0,2% para a determinação de lise de fundo e a lise máxima, respectivamente. Após incubação durante 20 min em temperatura ambiente, o sobrenadante é removido e plasma humano 20% (v/v) ou soro em DMEM (pré-aquecido a 37°C) é adicionado às células e incubado durante mais 20 min a 37°C. Todas as células de cada amostra são adicionadas à solução de iodeto de propídio (10 µg/ml). Em seguida, os sobrenadantes são substituídos por PBS contendo 2,5 µg/ml de brometo de etídio e a emissão de fluorescência mediante excitação a 520 nm é medida a 600 nm usando Tecan Safire. A lise específica percentual é calculada da seguinte forma: % de lise específica =  $\frac{\text{amostra de fluorescência} - \text{fundo de fluorescência}}{\text{lise máxima de fluorescência} - \text{fundo de fluorescência}} \times 100$ .

#### *Inibição da proliferação celular por anticorpos monoclonais:*

Para testar a capacidade de iniciar a apoptose, anticorpos monoclonais anti-CLDN6 podem, por exemplo, ser incubados com células tumorais CLDN6 positivas ou células tumorais transfectadas com CLDN6 a 37°C durante cerca de 20

horas. As células podem ser colhidas, lavadas em tampão de ligação Annexin-V (BD Biosciences) e incubadas com Annexin V conjugada com FITC ou APC (BD Biosciences) durante 15 min no escuro. Todas as células de cada amostra podem ser adicionadas à solução de IP (10 µg/ml em PBS) em um tubo FACS e avaliadas imediatamente por citometria de fluxo (como acima). Alternativamente, uma inibição geral da proliferação celular por anticorpos monoclonais pode ser detectada com kits disponíveis comercialmente. O kit de proliferação celular DELFIA (Perkin-Elmer, No. Cat. AD0200) é um imunoensaio não isotópico baseado na medição da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante a síntese de DNA de células em proliferação em microplacas. BrdU incorporado é detectado usando anticorpo monoclonal marcado com európio. Para permitir a detecção do anticorpo, as células são fixadas e o DNA é desnaturado usando solução Fix. O anticorpo não ligado é removido por lavagem e o indutor DELFIA é adicionado para dissociar os íons de európio do anticorpo marcado em solução, onde eles formam quelatos altamente fluorescentes com componentes do indutor DELFIA. A fluorescência medida - utilizando fluorimetria resolvida no tempo na detecção - é proporcional à síntese de DNA na célula de cada poço.

#### **Estudos pré-clínicos.**

Os anticorpos monoclonais que se ligam à CLDN6 também podem ser testados em um modelo *in vivo* (por exemplo, em camundongos imunodeficientes que transportam tumores xenoenxertados inoculados com linhagens celulares que expressam CLDN6, possivelmente após a transfecção) para determinar a eficácia destes no controle do crescimento de células tumorais que expressam CLDN6.

Estudos *in vivo* após o xenoenxerto de células tumorais que expressam CLDN6 em camundongos imunocomprometidos ou outros animais podem ser realizados utilizando os anticorpos da invenção. Os anticorpos podem ser administrados em camundongos isentos de tumor seguido por injeção de células tumorais para medir os efeitos dos anticorpos para prevenir a formação de tumores ou de sintomas relacionados com tumor. Os anticorpos podem ser administrados aos camundongos com tumor para determinar a eficácia terapêutica dos respectivos anticorpos para reduzir o crescimento tumoral, a metástase ou os sintomas relacionados com tumor. A aplicação de anticorpos pode ser combinada com a aplicação de outras substâncias, como fármacos cistostáticos, inibidores do fator de crescimento, bloqueadores do ciclo celular, inibidores da angiogênese ou outros anticorpos para determinar a eficácia sinérgica e a toxicidade potencial das combinações. Para analisar os

efeitos colaterais tóxicos mediados pelos anticorpos da invenção, os animais podem ser inoculados com anticorpos ou reagentes de controle e completamente investigados quanto aos sintomas possivelmente relacionados com a terapia de anticorpo para CLDN6. Os possíveis efeitos colaterais da aplicação *in vivo* de anticorpos CLDN6 particularmente incluem toxicidade em tecidos que expressam CLDN6, incluindo a placenta. Anticorpos que reconhecem CLDN6 em seres humanos e em outras espécies, por exemplo, camundongos, são particularmente úteis para prever efeitos colaterais potenciais mediados pela aplicação de anticorpos monoclonais para CLDN6 em seres humanos.

#### **Mapeamento de epítomos.**

O mapeamento de epítomos reconhecidos pelos anticorpos da invenção pode ser realizado como descrito em detalhes em "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology), por Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 e em "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248, por Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

#### **I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se ligam à CLDN6.**

Em ainda outra modalidade da invenção, os anticorpos para CLDN6 podem ser derivatizados ou ligados a outra molécula funcional, por exemplo, outro peptídeo ou proteína

(por exemplo, um fragmento Fab') para gerar uma molécula biespecífica ou multiespecífica, que se liga aos sítios de ligação múltiplos ou epítomos alvo. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou outra forma) a uma ou mais outras moléculas de ligação, tais como outro anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação.

Por conseguinte, a presente invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas compreendendo pelo menos uma primeira especificidade de ligação para CLDN6 e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítomo alvo. Em uma modalidade particular da invenção, o segundo epítomo alvo é um receptor Fc, por exemplo, Fc-gamaRI humano (CD64) ou um receptor Fc-alfa humano (CD89), ou um receptor de células T, por exemplo, CD3. Portanto, a invenção inclui moléculas biespecíficas e multiespecíficas capazes de se ligar tanto às células efetoras expressando Fc-gamaR, Fc-alfaR ou Fc-epsilonR (por exemplo, monócitos, macrófagos ou células polimorfonucleares (PMNs)) quanto às células alvo expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares. Estas moléculas biespecíficas e multiespecíficas podem alvejar células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas

por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares para células efetoras e podem desencadear atividades de células efetoras mediadas pelo receptor Fc, como a fagocitose de células expressando CLDN6 e sendo  
5 caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), liberação de citocina ou a geração do ânion superóxido.

Moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção  
10 podem ainda incluir uma terceira especificidade de ligação, além de uma especificidade de ligação anti-Fc e de uma especificidade de ligação anti-CLDN6. Em uma modalidade, a terceira especificidade de ligação é uma porção do fator anti-intensificação (EF), por exemplo, uma molécula que se  
15 liga a uma proteína de superfície envolvida na atividade citotóxica e, deste modo, aumenta a resposta imune contra a célula alvo. A "porção do fator anti-intensificação" pode ser um anticorpo, um fragmento de anticorpo funcional ou um ligante que se liga a uma dada molécula, por exemplo, a um  
20 antígeno ou a um receptor e, desse modo, resulta em uma intensificação do efeito dos determinantes de ligação para o receptor de Fc ou antígeno de célula alvo. A "porção do fator de anti-intensificação" pode ligar a um receptor Fc ou a um antígeno de célula alvo. Alternativamente, a porção



do fator anti-intensificação pode se ligar a uma entidade que é diferente da entidade à qual a primeira e segunda especificidades de ligação se ligam. Por exemplo, a porção do fator anti-intensificação pode se ligar a uma célula T citotóxica (por exemplo, via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 ou outra célula imune que resulta em uma resposta imune aumentada contra a célula alvo).

Em uma modalidade, as moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção compreendem como uma especificidade de ligação pelo menos um anticorpo, incluindo, por exemplo, um Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv ou um Fv de cadeia única. O anticorpo também pode ser um dímero de cadeia leve ou de cadeia pesada, ou qualquer fragmento mínimo deste, como um Fv ou um constructo de cadeia simples, tal como descrito em Ladner e col., US 4,946,778. O anticorpo também pode ser uma proteína de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação, como divulgado em US2003/0118592 e US 2003/0133939.

Em uma modalidade, moléculas biespecíficas e multiespecíficas da invenção compreendem uma especificidade de ligação para um Fc-gamaR ou um Fc-alfaR presentes na superfície de uma célula efetora, e uma segunda especificidade de ligação para um antígeno da célula alvo, por exemplo, CLDN6.

Em uma modalidade, a especificidade de ligação para um receptor Fc é fornecida por um anticorpo monoclonal, a ligação do qual não sendo bloqueada pela imunoglobulina G humana (IgG). Tal como aqui utilizado, o termo "receptor 5 IgG" se refere a qualquer um dos oito genes da cadeia gama localizados no cromossomo 1. Estes genes codificam um total de doze isoformas de receptor solúvel ou transmembrana, que estão agrupados em três classes de receptor Fc-gama: Fc-gamaRI (CD64), FC-gamaRII (CD32) e Fc-gamaRIII (CD16). Em 10 uma modalidade preferida, o receptor Fc-gama é um Fc-gamaRI humano de alta afinidade.

Em ainda outras modalidades preferidas, a especificidade de ligação para um receptor Fc é fornecida por um anticorpo que se liga a um receptor IgA humano, por exemplo, um receptor Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), a ligação 15 do qual não sendo de preferência bloqueada pela imunoglobulina humana A (IgA). O termo "receptor IgA" se destina a incluir o produto gênico de um alfa gene (Fc-alfaRI) localizado no cromossoma 19. Este gene é conhecido por codificar várias isoformas transmembranares 20 alternativamente unidas de 55 a 110 KDa. Fc-alfaRI (CD89) é expresso constitutivamente em monócitos/macrófagos, granulócitos eosinofílicos e neutrofílicos, mas não em populações de células não efetoras. Fc-alfaRI tem afinidade

média tanto para IgA1 quanto para IgA2, que é aumentada mediante a exposição às citocinas, como G-CSF ou GM-CSF (Morton, H. C. e col. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Quatro anticorpos monoclonais Fc-alfaRI  
5 específicos, identificados como A3, A59, A62 e A77, que se ligam ao Fc-alfaRI fora do domínio de ligação do ligante IgA, foram descritos (Monteiro, R. C. e col. (1992) J. Immunol 148: 1764).

Em outra modalidade, a molécula biespecífica é  
10 compreendida de dois anticorpos monoclonais de acordo com a invenção, que têm atividades funcionais complementares, tais como um anticorpo predominantemente funcional pela indução de CDC e o outro anticorpo predominantemente funcional por indução de apoptose.

15 Um "anticorpo específico de célula efetora", tal como aqui utilizado, se refere a um anticorpo ou fragmento de anticorpo funcional que se liga ao receptor Fc das células efetoras. Os anticorpos preferidos para utilização na presente invenção se ligam ao receptor Fc de células  
20 efetoras em um sítio que não está ligado por imunoglobulina endógena.

Tal como aqui utilizado, o termo "célula efetora" se refere a uma célula imune que está envolvida na fase efetora de uma resposta imune, em oposição às fases

cognitiva e de ativação de uma resposta imune. Exemplos de células imunes incluem células de origem mieloide ou linfoide, por exemplo, linfócitos (como células B e células T, incluindo células T citolíticas (CTLs), células "killer", células "natural killer", macrófagos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulócitos, mastócitos e basófilos. Algumas células efetoras expressam receptores Fc específicos e realizam funções imunes específicas. Em modalidades preferidas, uma célula efetora é capaz de induzir a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), por exemplo, um neutrófilo capaz de induzir ADCC. Por exemplo, monócitos e macrófagos que expressam FcR estão envolvidos na morte específica de células alvo e na apresentação de antígenos a outros componentes do sistema imune ou a ligação às células que apresentam antígenos. Em outras modalidades, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo, célula alvo ou microrganismo. A expressão de uma FcR particular em uma célula efetora pode ser regulada por fatores humorais, tais como citocinas. Por exemplo, verificou-se que a expressão de Fc-gamaRI é suprarregulada por interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Esta expressão realçada aumenta a atividade citotóxica de células que transportam Fc-gamaRI contra os alvos. Uma célula efetora pode fagocitar ou lisar um antígeno alvo ou

uma célula alvo.

"Célula alvo" deve significar qualquer célula indesejável em um indivíduo (por exemplo, um ser humano ou animal) que pode ser alvejada por um anticorpo da invenção.

5 Em modalidades preferidas, a célula alvo é uma célula que expressa ou superexpressa CLDN6 e é caracterizada pela associação de CLDN6 com a sua superfície celular. Células expressando CLDN6 e sendo caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares incluem,

10 tipicamente, as células tumorais.

## II. Imunoconjugados.

Em outro aspecto, a presente invenção apresenta um anticorpo anti-CLDN6 conjugado a uma porção ou agente terapêutico, tal como uma citotoxina, um fármaco (por

15 exemplo, um imunossupressor) ou um radioisótopo. Tais conjugados são aqui referidos como "imunoconjugados". Imunoconjugados que incluem uma ou mais citotoxinas são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para e,

20 em particular, mata as células. Exemplos incluem o taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracinaadiona, mitoxantrona, mitramicina,

actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina e análogos ou homólogos destes.

Agentes terapêuticos adequados para a formação de  
5 imunoconjugados da presente invenção incluem, mas não estão limitados, aos antimetabólicos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucil, melfalano,  
10 carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) e doxorrubicina), antibióticos (por exemplo,  
15 dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)) e agentes antimitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina). Em uma modalidade preferida, o agente terapêutico é um agente citotóxico ou um agente radiotóxico. Em outra modalidade, o agente  
20 terapêutico é um imunossupressor. Em ainda outra modalidade, o agente terapêutico é GM-CSF. Em uma modalidade preferida, o agente terapêutico é doxorrubicina, cisplatina, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucil, ciclofosfamida ou ricina A.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser conjugados a um radioisótopo, por exemplo, iodo-131, ítrio-90 ou índio-111, para gerar radiofármacos citotóxicos para o tratamento de uma desordem relacionada com CLDN6, tal como um câncer. Os conjugados de anticorpo da invenção podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica e a porção do fármaco não deve ser interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção do fármaco pode ser uma proteína ou um polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa ou um fragmento ativo da mesma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina diftérica; uma proteína tal como o fator de necrose tumoral ou interferon- $\gamma$ ; ou modificadores da resposta biológica, tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos ("GM-CSF"), fator estimulante de colônias de granulócitos ("G-CSF") ou outros fatores de crescimento.

Técnicas para conjugar tal porção terapêutica aos anticorpos são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon e col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer

Therapy, Reisfeld e col. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom e col., "Antibodies For Drug Delivery", em Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson e col. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 5 "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera e col. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer 10 Therapy", em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin e col. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe e col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

15 Em uma modalidade adicional, os anticorpos de acordo com a invenção estão ligados a um ligante-quelante, por exemplo, tiuxetano, que permite que o anticorpo seja conjugado a um radioisótopo.

### **III. Composições farmacêuticas.**

20 Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos da presente invenção. As composições farmacêuticas podem ser formuladas com veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis, bem



como quaisquer outros adjuvantes e excipientes conhecidos, de acordo com técnicas convencionais, tais como aquelas divulgadas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Em uma modalidade, as composições incluem  
5 uma combinação de múltiplos (por exemplo, dois ou mais) anticorpos isolados da invenção que atuam por mecanismos diferentes, por exemplo, um anticorpo que atua predominantemente por indução de CDC em combinação com  
10 outro anticorpo que predominantemente atua por indução de apoptose.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de  
15 combinação pode incluir uma composição da presente invenção com pelo menos um agente anti-inflamatório ou, pelo menos, um agente imunossupressor. Em uma modalidade, tais agentes terapêuticos incluem um ou mais agentes anti-inflamatórios, tais como um fármaco esteroidal ou um AINES (fármaco anti-  
20 inflamatório não esteroidal). Agentes preferidos incluem, por exemplo, aspirina e outros salicilatos, inibidores da COX-2, tais como rofecoxib (Vioxx) e celecoxib (Celebrex), AINES, tais como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindaco (Clinoril),

diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolaco (Lodine), oxaprozina (Daypro) e indometacina (Indocin).

5        Em outra modalidade, tais agentes terapêuticos incluem agentes que levam à depleção ou inativação funcional de células T regulatórias, como ciclofosfamida de baixa dose, anticorpos anti-CTLA4, anticorpos anti-IL2 ou anti-receptor de IL2.

10        Em ainda outra modalidade, tais agentes terapêuticos incluem um ou mais agentes quimioterápicos, tais como derivados de taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluoruracil, doxorubicina (Adriamicina), cisplatina (Platinol), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar). Em outra  
15        modalidade, os anticorpos da presente invenção podem ser administrados em combinação com agentes quimioterápicos, que apresentam, preferivelmente, eficácia terapêutica em pacientes que sofrem de câncer, por exemplo, os tipos de câncer como aqui descritos.

20        Em ainda outra modalidade, os anticorpos da invenção podem ser administrados em conjunto com a radioterapia e/ou células tronco periféricas autólogas ou transplante de medula óssea.

Tal como aqui utilizado, "veículo farmacologicamente

aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. De preferência, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, por exemplo, anticorpo, molécula biespecífica e multiespecífica, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

Um "sal farmacêuticamente aceitável" se refere a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto original e que não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (ver, por exemplo, Berge, S.M., e col. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como ácido clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e semelhantes, bem como a partir de ácidos orgânicos não tóxicos, tais como os ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos

alcanoicos fenil substituídos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Os sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino-terrosos, tais como de 5 sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

10 Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será percebido pela pessoa versada na técnica, a via e/ou modo de administração irá variar, dependendo dos resultados desejados. Os compostos ativos 15 podem ser preparados com veículos que irão proteger o composto contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biocompatíveis biodegradáveis podem ser 20 utilizados, tais como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para a preparação de tais formulações são geralmente conhecidos pelas pessoas versadas na técnica. Ver, por exemplo,

Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Para administrar um composto da invenção por determinadas vias de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o composto com um material para prevenir a sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um indivíduo em um veículo apropriado, como lipossomas, ou um diluente. Os diluentes farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções tampão salina e aquosa. Os lipossomas incluem emulsões CGF água-em-óleo-em-água, bem como lipossomas convencionais (Strejan e col. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A utilização de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o seu uso nas composições farmacêuticas da presente invenção é contemplado. Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e

armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada à concentração de fármaco elevada. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido, e similares), e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido, no caso de dispersão, e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como o manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida pela inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por microfiltração de esterilização.

Geralmente, dispersões são preparadas pela incorporação do composto ativo em um veículo estéril que

contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos da preparação são secagem a vácuo e liofilização, que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração do mesmo.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer uma resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único "bolo" pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada, como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária tal como aqui utilizada se refere às unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido.

Exemplos de antioxidantes farmacologicamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como o ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares.

Para as composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem aquelas adequadas para administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica farmacêutica. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem unitária irá variar, dependendo do indivíduo a ser tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem unitária será geralmente a



quantidade da composição que produz um efeito terapêutico.

As formulações da presente invenção que são adequadas para administração vaginal também incluem formulações de supositórios vaginais, tampões, cremes, géis, pastas, 5 espumas ou sprays contendo tais veículos, como são conhecidos na técnica para serem apropriados. As formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de composições desta invenção incluem pós, sprays, unguentos, pastas, cremes, loções, géis, soluções, emplastros e 10 inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um veículo farmacêuticamente aceitável e com quaisquer conservantes, tampões ou propelentes que possam ser requeridos.

As frases "administração parenteral" e 15 "parenteralmente administrados", tal como aqui utilizadas, significam modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, 20 intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados

que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, poliois (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e similares), e suas misturas adequadas, óleos vegetais, tal como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização quanto pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ocorrer pela inclusão de agentes que retardam a absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

Independentemente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção que podem ser utilizados

sob uma forma hidratada apropriada e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formulados em formas de dosagem farmacêuticamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

5 Os níveis de dosagem efetivos dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem variar de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição, e modo de  
10 administração particular sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos, incluindo a atividade das composições particulares utilizadas na presente invenção, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de  
15 excreção do composto particular sendo utilizado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, idade, sexo, peso, condição, estado geral de saúde e histórico clínico anterior do paciente sendo  
20 tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos nas artes médicas.

Um clínico ou veterinário com conhecimentos normalmente versados na técnica pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica

requerida. Por exemplo, o clínico ou veterinário poderia iniciar com doses dos compostos da invenção utilizados na composição farmacêutica em níveis mais baixos do que o necessário para atingir o efeito terapêutico desejado e  
5 aumentar gradualmente a dosagem até o efeito desejado ser alcançado. Em geral, uma dose diária adequada de uma composição da invenção será aquela quantidade do composto que é a dose eficaz mais baixa para produzir um efeito terapêutico. Tal dose eficaz dependerá geralmente dos  
10 fatores descritos acima. É preferível que a administração seja intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, de preferência administrada proximal ao sítio do alvo. Se desejado, a dose diária eficaz de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas,  
15 três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados durante todo o dia, opcionalmente, nas formas de dosagens unitárias. Embora seja possível para um composto da presente invenção ser administrado isoladamente, é preferível administrar o  
20 composto como uma formulação farmacêutica (composição).

Em uma modalidade, os anticorpos da invenção podem ser administrados por infusão, de preferência por infusão contínua lenta durante um longo período, tal como mais de 24 horas, a fim de reduzir os efeitos colaterais tóxicos. A

administração também pode ser realizada por infusão contínua durante um período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Tal regime pode ser repetido uma ou mais vezes conforme necessário, por exemplo, após 6 meses ou 12 meses.

5 A dosagem pode ser determinada ou ajustada através da medição da quantidade de anticorpos monoclonais anti-CLDN6 circulantes mediante a administração em uma amostra biológica pelo uso de anticorpos anti-idiotípicos que alvejam os anticorpos anti-CLDN6.

10 Em ainda outra modalidade, os anticorpos são administrados por terapia de manutenção, tal como, por exemplo, uma vez por semana durante um período de 6 meses ou mais.

Em ainda outra modalidade, os anticorpos de acordo com  
15 a invenção podem ser administrados por um regime incluindo uma infusão de um anticorpo contra CLDN6, seguido por uma infusão de um anticorpo contra CLDN6 conjugado a um radioisótopo. O regime pode ser repetido, por exemplo, de 7 a 9 dias depois.

20 Em uma modalidade da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas. Em uma modalidade mais preferida, os lipossomas incluem uma porção de alvejamento. Em uma modalidade mais preferida, os compostos terapêuticos nos lipossomas são distribuídos por

injeção em bolo num local proximal à área desejada, por exemplo, o local de um tumor. A composição deve ser fluida de maneira que exista uma fácil "seringabilidade". Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos.

Em uma modalidade adicional, os anticorpos da invenção podem ser formulados para prevenir ou reduzir os seus transportes através da placenta. Isto pode ser feito por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por PEGulação dos anticorpos ou pelo uso de fragmentos F(ab)<sub>2</sub>'. Outras referências podem ser feitas a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; e a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" para terapia tumoral pode ser medida por respostas tumorais objetivas, que podem ser tanto completas quanto parciais. Uma resposta completa (CR) é definida como ausência de evidência clínica, radiológica ou outra, de doença. Uma resposta parcial (PR) resulta de uma redução no tamanho do tumor agregado de mais do que 50%. O tempo médio de progressão é

uma medida que caracteriza a durabilidade da resposta tumoral objetiva.

Uma "dosagem terapeuticamente eficaz" para a terapia tumoral também pode ser medida pela sua capacidade de estabilizar a progressão da doença. A capacidade de um composto para inibir o câncer pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada por análise da capacidade do composto para inibir o crescimento celular ou apoptose por ensaios *in vitro* conhecidos pelo profissional versado na técnica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor, ou, de outra forma, melhorar os sintomas em um indivíduo. Uma pessoa versada na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em tais fatores, como o tamanho do indivíduo, a gravidade dos sintomas do indivíduo e a composição particular ou da via de administração selecionada.

A composição deve ser estéril e fluida na medida em que a composição é administrável por seringa. Além de água, o veículo pode ser uma solução salina tamponada isotônica, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e similares), e misturas

adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, por utilização de revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de tensoativos. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio na composição. A absorção a longo prazo das composições injetáveis pode ser provocada pela inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio ou gelatina.

Quando o composto ativo é adequadamente protegido, como descrito acima, o composto pode ser administrado por via oral, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável.

#### **IV. Usos e Métodos da Invenção.**

Os anticorpos (incluindo imunoconjugados, composições biespecíficas/multiespecíficas, e outros derivados aqui descritos) da presente invenção têm numerosas utilidades terapêuticas que envolvem o tratamento de distúrbios envolvendo as células que expressam CLDN6 e sendo caracterizados por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares. Por exemplo, os anticorpos podem ser administrados às células em cultura, por exemplo, in vitro



ou ex vivo, ou a indivíduos humanos, por exemplo, in vivo, para tratar ou prevenir uma variedade de distúrbios, tais como aqueles aqui descritos. Indivíduos preferidos incluem pacientes humanos com distúrbios que podem ser corrigidos ou melhorados pela morte das células doentes, em particular células caracterizadas por um padrão de expressão alterado de CLDN6 e/ou um padrão alterado de associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares em comparação com as células normais.

10 Por exemplo, em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção podem ser usados para tratar um indivíduo com um distúrbio tumorigênico, por exemplo, um distúrbio caracterizado pela presença de células tumorais que expressam CLDN6 e sendo caracterizado pela associação de  
15 CLDN6 com as suas superfícies celulares. Exemplos de doenças tumorigênicas que podem ser tratadas e/ou prevenidas englobam todos os cânceres que expressam CLDN6 e entidades tumorais, incluindo aquelas aqui descritas.

As composições farmacêuticas e métodos de tratamento  
20 descritos de acordo com a invenção podem também ser utilizados para a imunização ou vacinação para prevenir uma doença aqui descrita.

Em outra modalidade, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para detectar níveis de CLDN6 ou de formas

particulares de CLDN6, ou níveis de células que contêm CLDN6 nas suas superfícies da membrana, cujos níveis podem então ser ligados a certas doenças ou sintomas de doença tais como os descritos acima. Alternativamente, os anticorpos podem ser utilizados para esgotar ou interagir com a função das células que expressam CLDN6 e são caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, implicando, dessa forma, estas células como mediadores importantes da doença. Isto pode ser conseguido através do contato entre uma amostra e uma amostra de controle com o anticorpo anti-CLDN6 sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo e CLDN6. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e CLDN6 são detectados e comparados na amostra e numa amostra de controle, isto é, uma amostra de referência.

Os anticorpos da invenção podem ser inicialmente testados quanto às suas atividades de ligação associadas com usos terapêuticos ou de diagnóstico *in vitro*. Por exemplo, os anticorpos podem ser testados utilizando ensaios de citometria de fluxo tais como aqui descritos.

Os anticorpos da invenção podem ser utilizados para descobrir *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes atividades biológicas: inibir o crescimento e/ou a

diferenciação de uma célula que expressa CLDN6 e é caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular; matar uma célula que expressa CLDN6 e sendo caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular; mediar a fagocitose ou ADCC de uma célula que expressa CLDN6 e sendo caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular na presença de células efetoras; mediar CDC de uma célula que expressa CLDN6 e sendo caracterizado pela associação de CLDN6 com a sua superfície celular na presença de complemento; mediar a apoptose de uma célula que expressa CLDN6 e sendo caracterizada por associação de CLDN6 com a sua superfície celular; induzir a adesão homotípica; e/ou induzir a translocação em bolsas lipídicas mediante a ligação de CLDN6.

Em uma modalidade particular, os anticorpos são utilizados *in vivo* ou *in vitro* para tratar, prevenir ou diagnosticar uma variedade de doenças relacionadas com CLDN6. Exemplos de doenças relacionadas com CLDN6 incluem, entre outras, cânceres tais como os aqui descritos.

Como descrito acima, anticorpos anti-CLDN6 da invenção podem ser coadministrados com um ou mais outros agentes terapêuticos, por exemplo, um agente citotóxico, um agente radiotóxico, um agente antiangiogênico ou um agente

imunossupressor para reduzir a indução de respostas imunes contra os anticorpos da invenção. O anticorpo pode estar ligado ao agente (tal como um imunocomplexo) ou pode ser administrado em separado do agente. Neste último caso  
5 (administração separada), o anticorpo pode ser administrado antes, após ou simultaneamente com o agente ou pode ser coadministrado com outras terapias conhecidas, por exemplo, uma terapia anticâncer, como radiação. Tais agentes terapêuticos incluem, entre outros, agentes  
10 antineoplásicos, tais como aqueles listados acima. A coadministração dos anticorpos anti-CLDN6 da presente invenção com agentes quimioterápicos fornece dois agentes anticancerígenos que operam através de diferentes mecanismos que produzam um efeito citotóxico para as  
15 células tumorais. Tal coadministração pode resolver os problemas devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos ou a uma mudança na antigenicidade das células tumorais, o que as tornaria não reativas com o anticorpo.

As composições (por exemplo, anticorpos, moléculas  
20 multiespecíficas e biespecíficas e imunoconjugados) da invenção que têm sítios de ligação do complemento, tais como porções de IgG1, 2 ou 3 ou IgM que se liga ao complemento, também podem ser usadas na presença de complemento. Em uma modalidade, o tratamento ex vivo de uma

população de células compreendendo as células alvo com um agente de ligação da invenção e células efetoras adequadas podem ser suplementado pela adição de complemento ou de soro contendo complemento. A fagocitose das células alvo  
5 revestidas com um agente de ligação da presente invenção pode ser melhorada através da ligação de proteínas do complemento. Em outra modalidade, as células alvo revestidas com as composições da invenção podem também ser lisadas pelo complemento. Em ainda outra modalidade, as  
10 composições da invenção não ativam o complemento.

As composições da invenção podem também ser administradas juntamente com complemento. Assim, estão dentro do escopo da invenção as composições que compreendem anticorpos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas e  
15 soro ou complemento. Estas composições são vantajosas na medida em que o complemento está localizado em estreita proximidade com os anticorpos, moléculas multiespecíficas ou biespecíficas.

Alternativamente, os anticorpos, moléculas  
20 multiespecíficas ou biespecíficas da invenção e o complemento ou soro podem ser administrados separadamente. A ligação das composições da presente invenção nas células alvo pode causar a translocação do complexo antígeno-anticorpo de CLDN6 em bolsas lipídicas da membrana celular.

Tal translocação cria uma elevada densidade de complexos antígeno-anticorpo que pode eficientemente ativar e/ou intensificar a CDC.

Também estão dentro do escopo da presente invenção os kits que compreendem as composições de anticorpo da invenção (por exemplo, anticorpos e imunoconjugados) e instruções de utilização. O kit pode ainda conter um ou mais reagentes adicionais, tais como um reagente imunossupressor, um agente citotóxico ou um agente radiotóxico, ou um ou mais anticorpos adicionais da invenção (por exemplo, um anticorpo possuindo uma atividade complementar).

Consequentemente, os pacientes tratados com as composições do anticorpo da invenção podem ser adicionalmente administrados (antes de, simultaneamente com ou após a administração de um anticorpo da invenção) com outro agente terapêutico, tal como um agente citotóxico ou radiotóxico, o qual intensifica ou aumenta o efeito terapêutico dos anticorpos da invenção.

Em outras modalidades, o indivíduo pode ser adicionalmente tratado com um agente que modula, por exemplo, intensifica ou inibe, a expressão ou atividade dos receptores Fc-gama ou Fc-alfa, por exemplo, tratando o indivíduo com uma citocina. Citocinas preferidos incluem

fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF). Outros agentes importantes para o aumento da  
5 eficácia terapêutica dos anticorpos e das composições farmacêuticas aqui descritas são  $\beta$ -glicanas, que são homopolissacarídeos de resíduos de glicose ramificada e que são produzidas por uma variedade de plantas e microrganismos, por exemplo, bactérias, algas, fungos,  
10 leveduras e grãos. Fragmentos de  $\beta$ -glicanas produzidos por organismos podem ser também utilizados. De preferência, a  $\beta$ -glicana é um polímero de  $\beta(1,3)$  glicose, em que pelo menos algumas das unidades estruturais de glicose, por exemplo, de 3 a 6% das unidades estruturais de glicose,  
15 possuem ramificações, tais como ramificações  $\beta(1,6)$ .

Em uma modalidade particular, a invenção fornece métodos para detectar a presença do antígeno CLDN6 em uma amostra, ou medir a quantidade de antígeno CLDN6, compreendendo o contato da amostra, e uma amostra de  
20 controle, com um anticorpo que se liga especificamente à CLDN6, sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo, ou porção do mesmo, e CLDN6. A formação de um complexo é então detectada, em que uma diferença de

formação de complexo entre a amostra comparada com a amostra de controle é indicativo da presença do antígeno CLDN6 na amostra.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para detectar a presença ou quantificar as células que expressam CLDN6 e sendo caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares *in vivo* ou *in vitro*. O método compreende (i) administrar a um indivíduo uma composição da invenção conjugada com um marcador detectável, e (ii) expor o indivíduo a um meio para detectar o dito marcador detectável para identificar áreas que contêm células que expressam CLDN6 e sendo caracterizadas pela associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares.

Métodos como os descritos acima são úteis, em particular, para o diagnóstico de doenças relacionadas com CLDN6 e/ou a localização de doenças relacionadas com CLDN6, tais como doenças cancerígenas. De preferência, uma quantidade de CLDN6 em uma amostra que é maior do que a quantidade de CLDN6 em uma amostra controle é indicativo da presença de uma doença relacionada com CLDN6 em um indivíduo, em particular um ser humano, a partir do qual a amostra é derivada.

Quando utilizado em métodos como descritos acima, um



anticorpo aqui descrito pode ser fornecido com um marcador que funciona para: (i) fornecer um sinal detectável; (ii) interagir com um segundo marcador para modificar o sinal detectável fornecido pelo primeiro ou segundo marcador, por exemplo, FRET (Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência), (iii) afetar a mobilidade, por exemplo, a mobilidade eletroforética, por carga, hidrofobicidade, formato ou outros parâmetros físicos, ou (iv) fornecer uma porção de captura, por exemplo, afinidade, anticorpo/antígeno ou complexação iônica. São adequados como marcadores estruturas, tais como marcadores fluorescentes, marcadores luminescentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, de preferência marcadores isotópicos estáveis, marcadores isobáricos, marcadores de enzimas, marcadores de partículas, em particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgânicas pequenas tal como biotina, ligantes de receptores ou moléculas de ligação, tais como proteínas de adesão celular ou lectinas, sequências de marcação compreendendo ácidos nucleicos e/ou resíduos de aminoácidos que podem ser detectados pelo uso de agentes de ligação, etc. Os marcadores compreendem, de uma forma não limitativa, sulfato de bário, ácido

iocetâmico, ácido iopanoico, ipodato de cálcio, diatrizoato de sódio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sódio e rádio diagnóstico, incluindo emissores de pósitron, tais como flúor-18 e carbono-11, 5 emissores gama, tais como iodo-123, tecnécio-99m, iodo-131 e índio-111, nuclídeos para ressonância magnética nuclear, tais como flúor e gadolínio.

Em ainda outra modalidade, os imunoconjugados da invenção podem ser utilizados para alvejar compostos (por 10 exemplo, agentes terapêuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, imunossuppressores, etc.) para células que têm CLDN6 associada com as suas superfícies através da ligação de tais compostos ao anticorpo. Assim, a invenção também fornece métodos para a localização de células *ex vivo* ou *in* 15 *vitro* que expressam CLDN6 e são caracterizadas por associação de CLDN6 com as suas superfícies celulares, tais como células tumorais circulantes.

A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser interpretados como 20 limitantes do escopo da invenção.

#### **EXEMPLOS**

As técnicas e métodos utilizados na presente invenção são aqui descritos ou realizados de uma maneira conhecida por si só e conforme descrito, por exemplo, em Sambrook e

col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos os métodos incluem o uso de kits e os reagentes são utilizados de acordo com a informação do fabricante, a menos que seja especificamente indicado.

**Exemplo 1: Quantificação da expressão de CLDN6 em tecidos normais, tecidos cancerosos e linhagens celulares utilizando PCR-RT em tempo real.**

O RNA celular total foi extraído a partir de espécimes de tecido congelado e linhagens celulares cancerosas utilizando o minikit RNeasy (Qiagen), preparado com um oligonucleotídeo dT<sub>18</sub> e transcrito reversamente com Superscript II (GIBCO/Lifetech), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do cDNA obtido foi testada por amplificação dos transcritos p53 em um PCR de 30 ciclos. Após a normalização para HPRT, a expressão de CLDN6 foi quantificada usando o cálculo  $\Delta\Delta CT$ .

Tecidos de três indivíduos foram testados para cada tipo de tecido normal. Apenas quantidades traço de transcritos de CLDN6 poderiam ser detectadas em tecidos normais após 40 ciclos de RT-PCR. O único tecido normal que excedeu ligeiramente o corte de expressão foi a placenta.

Ao contrário dos tecidos normais, nós encontramos alta expressão de CLDN6 em amostras de câncer de ovário

(adenocarcinomas), câncer de pulmão (NSCLC, com maior frequência e níveis de expressão em adenocarcinomas), câncer gástrico, câncer de mama, câncer hepático, câncer pancreático, câncer de pele (carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas), melanoma maligno, câncer de cabeça e pescoço (adenoma pleomórfico maligno), sarcoma (sarcoma sinovial e carcinossarcoma), câncer do duto biliar, câncer de célula renal (carcinoma de células claras e carcinoma papilar), câncer uterino e linhagens de células cancerosas A2780 (câncer de ovário), NIH-OVCAR3 (câncer de ovário), HCT-116 (câncer de cólon), EFO-27 (câncer de ovário), CPC-N (SCLC), NCI-H552 (NSCLC), SNU-1 (câncer gástrico), KATOIII (câncer gástrico), YAPC (câncer pancreático), AGS (câncer gástrico), FU97 (câncer gástrico), MKN7 (câncer gástrico).

**Exemplo 2: Quantificação da expressão de CLDN6 em tecidos normais, tecidos cancerosos e linhagens celulares utilizando análise de Western blot.**

Para a análise de Western blot, foram utilizadas 20 µg de proteína total extraída de células lisadas com o tampão de lise Laemmli. Os extratos foram diluídos em tampão de redução de amostra (Roth), submetidos à SDS-PAGE e subsequentemente eletrotransferidos em membrana PVDF (Pall). A imunomarcção foi realizada com anticorpos

policlonais reativos para CLDN6 (ARP) e beta-actina (Abcam), seguido pela detecção de anticorpos primários com anticorpos secundários de cabra anti-coelho ou de cabra anti-camundongo conjugados com a peroxidase de rábano silvestre (Dako).

Lisados de tecido de até cinco indivíduos foram testados para cada tipo de tecido normal. Nenhuma expressão de proteína CLDN6 foi detectada em qualquer um dos tecidos normais analisados. Ao contrário dos tecidos normais, uma alta expressão de proteína CLDN6 foi detectada em amostras de câncer do ovário e câncer de pulmão. A expressão de CLDN6 foi detectada em NIH-OVCAR3 (câncer de ovário), MKN7 (câncer gástrico), AGS (câncer gástrico), CPC-N (SCLC), HCT-116 (câncer de cólon), FU97 (câncer gástrico), NEC8 (carcinoma testicular embrionário), JAR (coriocarcinoma de placenta), JEG3 (coriocarcinoma de placenta), BEWO (coriocarcinoma da placenta) e PA-1 (teratocarcinoma de ovário).

### **Exemplo 3: Análise imunoistoquímica (IHC) da expressão de CLDN6 em tecidos normais e tecidos cancerosos.**

Seções de tecido embebidas em parafina (4  $\mu$ m) foram incubadas durante 1 hora a 58°C em uma placa de aquecimento (HI 1220, Leica). A parafina foi removida das seções por incubação das lâminas em Roticlear (Roth) durante 2 x 10

min em temperatura ambiente. Em seguida, as seções foram reidratadas em álcool graduado (99%, 2 x 96%, 80% e 70%, 5 min cada). A recuperação dos antígenos foi realizada pela ebulição das lâminas a 120°C (15 psi) durante 15 min em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) + Tween-20 0,05%. Diretamente após a ebulição, as lâminas foram incubadas em PBS durante 5 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogénio 0,3% em MeOH durante 15 min em temperatura ambiente. Para evitar a ligação não específica, as lâminas foram bloqueadas com soro de cabra a 10% em PBS durante 30 min em temperatura ambiente. Logo após, as lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal CLDN6-específico (1 µg/ml) (ARP) de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS em temperatura ambiente (3 x 5 min) e incubadas com 100 µl dos anticorpos secundários (IgG poli HRP-anti-coelho PowerVision pronta para uso (ImmunoLogic)) durante uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS em temperatura ambiente (3 x 5 min). A marcação final foi realizada usando o kit de substrato VECTOR NovaRED SK-4800 de Vector Laboratories (Burlingame). As seções foram contramarcadas com hematoxilina durante 90 segundos em temperatura ambiente. Após a desidratação com álcool graduado (70%, 80%, 2x 96% e 99%, 5 min cada) e 10

min de incubação em xilol, as lâminas foram montadas com o kit X-tra (Medité Histotechnic).

Nenhuma expressão de proteína CLDN6 foi detectável em tecidos normais de pulmão, ovário, estômago, cólon, pâncreas, fígado, duodeno ou rins. Ao contrário dos tecidos normais, marcação forte ou pelo menos significativa foi observada em seções de tecido de câncer de ovário, câncer de pulmão, câncer de pele, câncer pancreático, câncer gástrico, câncer de mama, câncer de bexiga (carcinoma de células de transição), câncer cervical, câncer testicular (seminoma) e câncer uterino. A marcação foi claramente acentuada na membrana plasmática das populações de células epiteliais malignas, enquanto que as células estromais e epiteliais não malignas adjacentes foram negativas. Estes resultados indicam que a proteína CLDN6 está localizada na membrana plasmática de células malignas.

#### **Exemplo 4: Geração de anticorpos murinos contra CLDN6.**

##### **a. Geração de vetores de expressão que codificam CLDN6 de comprimento total e fragmentos de CLDN6.**

Uma sequência de DNA códon-otimizada não natural (SEQ ID NO: 3) que codifica CLDN6 de comprimento total (número de acesso NCBI NP\_067018.2, SEQ ID NO: 2) foi preparada por síntese química (GENEART AG, Alemanha) e clonada no vetor pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen, EUA), produzindo o vetor

p3953. A inserção de um códon de parada permitiu a expressão da proteína CLDN6 sem ser fundida com a etiqueta myc-His codificada do vetor. A expressão de CLDN6 foi testada por Western blot, citometria de fluxo e análises de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-CLDN6 disponíveis comercialmente (ARP, 01-8865; R&D Systems, MAB3656).

Além disso, uma sequência de DNA códon-otimizada (SEQ ID NO: 4) que codifica para o fragmento do domínio extracelular putativo 2 (EC2) de CLDN6 (SEQ ID NO: 6) como uma fusão com um peptídeo sinal derivado do líder Ig capa N-terminal seguido por 4 aminoácidos adicionais para assegurar um correto sítio de clivagem de peptidase sinal (SEQ ID NO: 5) foi preparada e clonada no vetor pcDNA3.1/myc-His, produzindo o vetor p3974. Antes da imunização, a expressão do fragmento EC2 foi confirmada por microscopia de imunofluorescência em células CHO-K1 transitoriamente transfectadas e fixadas com paraformaldeído (PFA), usando um anticorpo anti-myc comercialmente disponível (Cell Signaling, MAB 2276).

**b. Geração de linhagens celulares expressando estavelmente CLDN6.**

As linhagens celulares HEK293 e P3X63Ag8U.1 que expressam estavelmente CLDN6 foram geradas por técnicas



padrão, utilizando o vetor p3953.

### **c. Imunizações.**

Camundongos Balb/c foram imunizados com 25 µg de DNA de plasmídeo p3974 em conjunto com 4 µl de PEI-manose (PEI-Man; in vivo-jetPEI™-Man de PolyPlus Transfection) (150 mM de PEI-Man em H<sub>2</sub>O com 5% de glicose) por injeção intraperitoneal nos dias 0, 16 e 36. Nos dias 48 e 62, os camundongos foram imunizados por injeção intraperitoneal com células de mieloma P3X63Ag8U.1 transfectadas com o vetor p3953 para expressar estavelmente CLDN6. As células administradas no dia 62 foram irradiadas com 3000 rad antes da injeção. A presença de anticorpos direcionados contra CLDN6 em soros de camundongos foi monitorada por microscopia de imunofluorescência entre os dias 20 e 70, utilizando células CHO-K1 cotransfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN6 e GFP. Para esta finalidade, 24 h após a transfecção, as células fixadas ou não fixadas com PFA foram incubadas com uma diluição de 1:100 de soros de camundongos imunizados durante 45 minutos em temperatura ambiente (RT). As células foram lavadas, incubadas com um anticorpo Ig anti-camundongo marcado com Alexa555 (Molecular Probes) e submetidas à microscopia de fluorescência.

Anticorpos anti-CLDN6 específicos foram detectados nas amostras de soro obtidas a partir de um camundongo, com base no qual o hibridoma F3-6C3-H8 foi produzido; ver figura 2.

5        Para a geração de anticorpos monoclonais, os camundongos com respostas imunes anti-CLDN6 detectáveis foram reforçados quatro dias antes da esplenectomia através de injeção intraperitoneal de  $2 \times 10^7$  células HEK293 estavelmente transfectadas com o vetor p3953.

10        **d. Geração de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais murinos contra CLDN6.**

6  $\times 10^7$  esplenócitos isolados a partir de um camundongo imunizado foram fundidos com  $3 \times 10^7$  células de linhagem celular de mieloma de camundongo P3X63Ag8.653  
15 (ATCC, CRL 1580) utilizando PEG 1500 (Roche, CRL 10783641001). As células foram semeadas a cerca de  $5 \times 10^4$  células por poço em placas de microtitulação de fundo chato e cultivadas durante cerca de duas semanas em meio seletivo RPMI contendo soro fetal bovino inativado pelo calor a 10%,  
20 suplemento de clonagem e fusão de hibridoma a 1% (HFCS, Roche, CRL 11363735), HEPES 10 mM, piruvato de sódio 1 mM, glicose 4,5%, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, suplemento 1  $\times$  penicilina/estreptomicina e 1  $\times$  HAT (Invitrogen, CRL 21060). Após 10 a 14 dias, os poços individuais foram

testados por citometria de fluxo para os anticorpos monoclonais anti-CLDN6. Hibridomas secretores de anticorpos foram subclonados por diluição limitante e novamente testados para os anticorpos monoclonais anti-CLDN6. Os  
5 subclones estáveis foram cultivados para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização. Pelo menos um clone de cada hibridoma que reteve a reatividade das células de origem (testado por citometria de fluxo) foi selecionado. Bancos de células de  
10 nove frascos foram gerados para cada clone e armazenados em nitrogênio líquido.

**Exemplo 5: Características de ligação dos sobrenadantes de hibridoma e anticorpos monoclonais.**

**a. Controle de qualidade de células HEK293T**  
15 **transitoriamente transfectadas por (i) Western blot e (ii) análises de citometria de fluxo.**

(i) Células HEK293T foram transfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN3, CLDN4, CLDN6, e CLDN9, respectivamente, ou pseudotransfectadas. A expressão de  
20 CLDN3, CLDN4, CLDN6 ou CLDN9 em células HEK293T foi determinada por *Western blotting*. Para esta finalidade, as células foram coletadas 24 horas após a transfecção e submetidas à lise. O lisado foi submetido a SDS-PAGE, riscado em membrana de nitrocelulose e marcado com

anticorpos anti-CLDN3(A) (Invitrogen, 34-1700), anti-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), anti-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) ou anti-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672), que se ligam especificamente ao C-terminal da claudina correspondente sob condições de desnaturação. Após a incubação com um anticorpo secundário marcado com peroxidase e desenvolvimento com reagente ECL, um visualizador LAS-3000 (Fuji) foi utilizado para visualização. Bandas dos pesos moleculares esperados de CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9, respectivamente, foram observadas apenas nas células transfectadas, mas não nas células controle (Figura 3), demonstrando que as células HEK293T não expressam endogenamente qualquer uma das claudinas investigadas e, assim, são uma ferramenta adequada para determinar a reatividade cruzada de anticorpos CLDN6.

(ii) As células HEK293T de (i) foram adicionalmente analisadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-CLDN que reconhecem epítomos nativos (IgG2a anti-CLDN3 de camundongo (R&D, MAB4620), IgG2a anti-CLDN4 de camundongo (R&D, MAB4219), IgG2b anti-CLDN6 de camundongo (R&D, MAB3656)). Os anticorpos obteníveis a partir de Sigma, sob os números de produto M9144 e M8894 serviram como controles de isotipo. A especificidade destes anticorpos anti-CLDN foi analisada utilizando células

HEK293T transitoriamente transfectadas com ácidos nucleicos que codificam CLDN3, CLDN4, CLDN6 e CLDN9, respectivamente.

O anticorpo anti-CLDN6 mostra reatividade cruzada com CLDN3, CLDN4 e CLDN9. O anticorpo anti-CLDN4 mostra reatividade cruzada com CLDN3, CLDN6 e CLDN9. O anticorpo anti-CLDN3 se liga especificamente à CLDN3 (figura 4).

**b. Determinação da especificidade dos anticorpos monoclonais produzidos de acordo com a invenção utilizando citometria de fluxo.**

10 Células HEK293T foram cotransfectadas com um vetor que codifica diferentes proteínas CLDN e um vetor que codifica um marcador de fluorescência. 24 h após a transfecção, as células foram coletadas usando solução de tripsina/EDTA 0,05% e lavadas com tampão FACS (PBS contendo FCS a 2% e 15 azida de sódio a 0,1%). As células foram transferidas para placas de microtitulação com fundo em U a  $2 \times 10^5$  células por poço e incubadas durante 60 min a 4°C com sobrenadantes de hibridoma. Após lavagem por três vezes com tampão FACS, as células foram incubadas com um anticorpo secundário 20 específico IgG 1+2a+2b+3 anti-camundongo conjugado com alofococianina (APC) (Dianova, 115-135-164). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes e a ligação foi avaliada por citometria de fluxo utilizando um BD FACSArray (Figura 5). A expressão do marcador de

fluorescência é representada graficamente no eixo horizontal contra a ligação do anticorpo no eixo vertical. Um anticorpo IgG2b anti-CLDN6 de camundongo comercialmente disponível (R&D, MAB3656) serviu como um controle positivo e o anticorpo obtenível a partir de Sigma, sob o número de produto M8894, serviu como um controle de isotipo.

Os anticorpos nos sobrenadantes dos subclones de hibridoma monoclonal F3-6C3-H2, F3-6C3-H8, F3-6C3-H9, F3-6C3-D8 e F3-6C3-G4, todos derivados do hibridoma F3-6C3, foram específicos para CLDN6 e não se ligaram à CLDN9, CLDN3 e CLDN4. A figura 5A mostra exemplarmente os resultados para o subclone de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8. Os anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 também se ligaram às células transfectadas com a variante (I143V)-SNP de CLDN6. Os anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F4-4F7-F2 se ligaram tanto à CLDN6 quanto CLDN9 (Figura 5A). Os anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-7B3-B4 se ligaram à CLDN6, CLDN3 e CLDN9 (Figura 5B). Os anticorpos no sobrenadante do subclone de hibridoma monoclonal F3-3F7-A5 se ligaram à CLDN6, CLDN4 e CLDN9 (Figura 5B).

**Exemplo 6: Geração e teste de anticorpos monoclonais contra CLDN6.**

**a. Geração dos vetores de expressão que codificam o domínio extracelular 1 de CLDN6.**

Uma sequência de DNA otimizada por códon (SEQ ID NO: 12) que codifica o fragmento do domínio extracelular putativo 1 (EC1) de CLDN6 (SEQ ID NO: 7) como uma fusão com um peptídeo sinal derivado líder Ig capa N-terminal seguido por 4 aminoácidos adicionais, para assegurar um correto sítio de clivagem de peptidase sinal (SEQ ID NO: 13) foi preparada e clonada no vetor pcDNA3.1/myc-His, produzindo o vetor p3973. Antes da imunização, a expressão do fragmento EC1 foi confirmada por microscopia de imunofluorescência em células CHO-K1 fixadas em paraformaldeído (PFA) e transitoriamente transfectadas, usando um anticorpo anti-myc comercialmente disponível (Cell Signaling, MAB 2276).

**b. Imunização.**

Camundongos Balb/c foram imunizados com 25 µg de DNA de plasmídeo p3973 em conjunto com 4 µl de PEI-manose (PEI-Man; jetPEI™-Man in vivo de PolyPlus Transfection) (PEI-Man em H<sub>2</sub>O 150 mM com glicose a 5%) por injeção intraperitoneal nos dias 0 e 14. Nos dias 28 e 44, os camundongos foram imunizados subcutaneamente com peptídeos KLH-conjugados SEQ ID NO: 14 e SEQ ID NO: 15 (100 µg de cada em PBS, JPT Peptide Technologies GmbH, Alemanha), juntamente com PTO-

CpG-ODN purificado por HPLC (25 µg em PBS; 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT; Eurofins MWG Operon, Alemanha). Nos dias 64, 77 e 97, os camundongos foram imunizados por injeção intraperitoneal com  $2 \times 10^7$  células de mieloma P3X63Ag8U.1, transfectadas com vetor p3953 para expressar estavelmente CLDN6. Antes da administração, as células foram tratadas com mitomicina-C (2,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, M4287). Nos dias 64 e 97, as células foram administradas juntamente com PTO-CpG-ODN purificado por HPLC (50 µg em PBS), no dia 77, juntamente com adjuvante de Freund incompleto.

Para a geração de anticorpos monoclonais, os camundongos com respostas imunes detectáveis anti-CLDN6 foram reforçados quatro dias antes da esplenectomia com injeção intraperitoneal de  $2 \times 10^7$  células HEK293 estavelmente transfectadas com vetor p3953.

### **c. Teste de anticorpos monoclonais contra CLDN6.**

#### Citometria de fluxo

Para testar a ligação dos anticorpos monoclonais à CLDN6 e seus homólogos, as células HEK293T foram transitoriamente transfectadas com o plasmídeo codificador de claudina correspondente e a expressão foi analisada por citometria de fluxo. A fim de diferenciar entre células



transfectadas e não transfectadas, as células HEK293T foram cotransfectadas com um marcador de fluorescência como umrelator. 24 h após a transfecção, as células foram coletadas com tripsina/EDTA 0,05%, lavadas com tampão FACS (PBS contendo FCS a 2% e azida de sódio a 0,1%) e ressuspendas em tampão FACS a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml. 100  $\mu$ l da suspensão de células foram incubados com o anticorpo apropriado nas concentrações indicadas durante 30 min a 4°C. Um anticorpo de reatividade cruzada foi utilizado para detectar a expressão de CLDN6 e CLDN9. Os anticorpos anti-claudina de camundongo disponíveis comercialmente anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) e anti-CLDN4 (R&D MAB4219) serviram como controles positivos, enquanto que IgG2a (Sigma, M9144) e IgG2b (Sigma, M8894) de camundongo, respectivamente, serviram como controle de isotipo. As células foram lavadas três vezes com tampão FACS e incubadas com um anticorpo secundário específico IgG 1+2a+2b+3a anti-camundongo conjugado com APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 min a 4°C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspendas em tampão FACS. A ligação foi analisada por citometria de fluxo utilizando BD FACSArray. A expressão do marcador de fluorescência foi representada graficamente no eixo horizontal contra a ligação do anticorpo no eixo vertical.

CDC

A citotoxicidade dependente do complemento (CDC) foi determinada por medição do teor de ATP intracelular em células não lisadas após a adição de complemento humano às células alvo incubadas com anticorpos anti-CLDN6. Como um método analítico muito sensível, a reação luminescente da luciferase foi utilizada para medir ATP.

Células CHO-K1 estavelmente transfectadas com CLDN6 (CHO-K1-CLDN6) foram coletadas com tripsina/EDTA 0,05%, lavadas duas vezes com meio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) e suspensas a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/ml em meio X-Vivo 15. 250  $\mu$ l da suspensão celular foram transferidos para uma cubeta de eletroporação de 0,4 cm e misturados com 7  $\mu$ g de RNA transcrito *in vitro* codificando a luciferase (RNA IVT de luciferase). As células foram eletroporadas a 200 V e 300  $\mu$ F utilizando Gene Pulser Xcell (Bio Rad). Após a eletroporação, as células foram suspensas em 2,4 ml de D-MEM/F12 pré-aquecido (1:1) com meio Glutamax-I (Invitrogen, 31331-093) contendo FCS a 10% (v/v), penicilina/estreptomicina 1% (v/v) e G418 1,5 mg/ml. 50  $\mu$ l da suspensão celular por poço foram semeados em uma placa PP de 96 poços brancos e incubada a 37°C e CO<sub>2</sub> a 7,5%. 24 h após a eletroporação, 50  $\mu$ l de anticorpos monoclonais anti-

CLDN6 de murino em RPMI a 60% (contendo HEPES 20 mM) e soro humano a 40% (pool de soro obtido a partir de seis doadores saudáveis) foram adicionados às células nas concentrações indicadas. 10 µl de Triton X-100 8% (v/v) em PBS por poço foram adicionados aos controles de lise total, enquanto que 10 µl de PBS por poço foram adicionados aos controles com máximo de células viáveis e às amostras efetivas. Após uma incubação de 80 min a 37°C e CO<sub>2</sub> 7,5%, 50 µl de mistura de luciferina (3,84 mg/ml de D-luciferina, 0,64 U/ml de ATPase e HEPES 160 mM em ddH<sub>2</sub>O) foram adicionados por poço. A placa foi incubada no escuro durante 45 min em temperatura ambiente. A luminescência foi medida utilizando um luminômetro (Infinite M200, TECAN). Os resultados são apresentados como unidades relativas de luz digital integrada (RLU).

As células NEC8 foram eletroporadas em 200 V e 400 µF e cultivadas em RPMI 1640 com meio Glutamax-I (Invitrogen, 61870) contendo FCS a 10% (v/v).

A lise específica é calculada como:

$$\text{lise específica [\%]} = 100 - \left[ \frac{(\text{amostra} - \text{lise total})}{(\text{células viáveis max} - \text{lise total})} \times 100 \right]$$

Células viáveis máx: PBS 10 µL, sem anticorpo

Lise total: 10 µl de Triton X-100 8% (v/v) em PBS,

sem anticorpo

#### Tratamento Inicial

Para os tratamentos de anticorpos iniciais,  $2 \times 10^7$  células NEC8 em 200  $\mu$ l de PBS foram inoculadas por via subcutânea no flanco de camundongos Nude-*Foxn1*<sup>nu</sup> atímicos. Cada grupo experimental consistiu de dez camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade. Três dias após a inoculação, 200  $\mu$ g de anticorpos monoclonais de murino purificados muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A foram aplicados durante 46 dias por alternância de injeções intravenosas e intraperitoneais duas vezes por semana. Os grupos experimentais tratados com PBS serviram como controles negativos. O volume tumoral ( $TV = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$ ) foi monitorado bissemanalmente. TV é expresso em mm<sup>3</sup>, permitindo a construção de curvas de crescimento tumorais ao longo do tempo. Quando o tumor atingiu um volume maior do que 1500 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram mortos.

#### **d. Resultados.**

Anticorpos monoclonais de murinos muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A mostraram forte ligação à CLDN6 humana e à variante I143V SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) de CLDN6, enquanto nenhuma ligação à CLDN3, 4 e 9 foi observada (Figura 6).

MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A exibiram valores de EC50 muito baixos (200 a 500 ng/ml de EC50) e a saturação de ligação foi alcançada em baixas concentrações (Figura 7).

5 MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A exibiram atividade CDC dependente da dose e induziram CDC em baixas concentrações (Figura 8). Os anticorpos anti-CLDN6 muMAB 65A e 66B induziram CDC em células NEC8 de uma forma dose-dependente (Figura 9). A especificidade alvo dos muMAB 65A  
10 e 66B foi provada usando células NEC8 LVTS2 54 (diminuição de CLDN6).

Além disso, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B e 67A apresentaram inibição do crescimento tumoral em camundongos enxertados com células NEC8 (Figura 10).

15 **Exemplo 7: Geração e teste de anticorpos monoclonais quiméricos contra CLDN6.**

**a. Geração de anticorpos monoclonais quiméricos de camundongo/humano.**

20 Para a quimerização, a região variável de cadeia leve e cadeia pesada de murino, incluindo as sequências líder, foram amplificadas por PCR utilizando iniciadores listados na tabela abaixo. As cadeias pesadas de murino foram fundidas ao sítio de restrição ApaI (5'-GGGCCC-3') pela parte N-terminal da cadeia Fcγ1 humana, que foi

codificada pelo vetor de expressão. Os domínios variáveis da cadeia capa de murino, incluindo sequências líder, foram clonados em frente da região constante usando um sítio de restrição BsiWI. A orientação correta da região constante no vetor, isto é, adequada para o promotor precedente do vetor, foi verificada por sequenciamento. Devido à posição do sítio de restrição ApaI, qualquer amplificação de uma região variável incluindo sequência líder para esta finalidade tem de incluir os primeiros 11 nucleotídeos da sequência da região constante gama-1 humana, além da sequência do sítio ApaI. A sequência de nucleotídeos da região constante da cadeia pesada gama-1 humana está listada como a SEQ ID NO: 24, a sequência de aminoácidos da, assim expressa, região constante gama-1 humana está listada como SEQ ID NO: 25. A sequência de nucleotídeos que codifica a parte constante da cadeia capa leve está listada como a SEQ ID NO: 26, a respectiva sequência de aminoácidos está listada como a SEQ ID NO: 27.

Tabela 1: Linhagens celulares de hibridoma de camundongo utilizadas para clonagem de anticorpo

	muMAB	Isotipo	SEQ ID de iniciador NOs:
Cadeia	64A	IgG2a	17, 18

pesada	89A	IgG2a	17, 19
	61D	IgG2a	17, 20
	67A	IgG2a	17, 20
Cadeia leve	64A	IgK	21, 22
	89A	IgK	21, 23
	61D	IgK	21, 22
	67A	IgK	21, 22

Correspondendo às suas contrapartes murinas, os anticorpos monoclonais quiméricos foram nomeados adicionando o prefixo "chim", por exemplo, chimAB 64A.

A amplificação das regiões variáveis de murino de cadeias leves e pesadas, incluindo sequências líder, foi realizada de acordo com o método de "PCR acelerada" descrito em Matz e col. (Nucleic Acids Research, 1999, vol. 27, No. 6). Para isso, o RNA total foi preparado a partir de linhagens de célula de hibridoma monoclonais (ver Tabela 1) por métodos padrão conhecidos pelas pessoas versadas na técnica, por exemplo, com o uso do Mini Kit RNeasy (Qiagen). cDNA de fita única foi preparado de acordo com o método de "mudança de molde", também descrito em Matz e col. (Nucleic Acids Research, 1999, vol. 27, No. 6, 1558). Além de um oligômero (dT)30 (SEQ ID NO: 28), ele incluiu um oligômero híbrido de DNA/RNA (SEQ ID NO: 29) servindo como um adaptador 5' para a mudança de molde durante a

polimerização da fita de cDNA. Neste oligômero adaptador, os últimos três nucleotídeos foram ribo- ao invés de desoxirribonucleotídeos. A subsequente "PCR acelerada" usou um oligômero *antisense* voltado para a região constante da  
5 cadeia capa de camundongo ou para a região constante da subclasse 2a da cadeia gama (SEQ ID NO: 30 e 31, respectivamente). A subclasse IgG do anticorpo monoclonal de murino produzida pelas linhagens celulares de hibridoma foi imunologicamente analisada antes com IsoStrip (Roche),  
10 e o oligômero *antisense* apropriado foi escolhido adequadamente (ver Tabela 1). Uma mistura de iniciador serviu como o oligômero *sense* na "PCR acelerada", compreendendo os dois oligômeros listados nas SEQ ID NO: 32 e 33.

15 As regiões variáveis de murino identificadas, incluindo sequências líder, foram então amplificadas por PCR omitindo a região constante de camundongo 3' e 5' UTR, adicionando sítios de restrição às extremidades que permitiram a subclonagem nos vetores de expressão  
20 preparados, carregando as regiões constantes humanas. Além disso, os oligômeros *sense* forneceram uma sequência Kozak de consenso (5'-GCCGCCACC-3') e os oligômeros *antisense* para as regiões variáveis da cadeia pesada incluíram os primeiros 11 nucleotídeos da região constante gama-1



humana, além do sítio de restrição ApaI (ver Tabela 1, SEQ ID NOs: 17 a 23). As regiões variáveis da cadeia leve capa, incluindo as sequências líder, foram clonadas utilizando as enzimas de restrição HindIII e BsiWI, regiões variáveis da  
5 cadeia pesada gama demandaram enzimas de restrição HindIII e ApaI.

Além disso, as regiões variáveis de murinos das cadeias leve e pesada, incluindo as sequências líder, foram amplificadas e novos anticorpos monoclonais quiméricos  
10 contra CLDN6 foram gerados de acordo com o protocolo descrito acima.

**b. Produção de anticorpos monoclonais anti-CLDN6 quiméricos.**

Anticorpos monoclonais quiméricos foram  
15 transitoriamente expressos em células HEK293T (ATCC CRL-11268) transfectadas com DNA de plasmídeo que codifica as cadeias leve e pesada do anticorpo correspondente. 24 h antes da transfecção,  $8 \times 10^7$  células foram semeadas em placas de cultura de 145 mm e cultivadas em 25 ml de meio  
20 HEK293T (DMEM/F12 + GlutaMAX-I, FCS 10%, penicilina/estreptomicina 1%). 20 µg de DNA de plasmídeo foram dissolvidos em 5 mL de meio HEK293T sem suplementos por placa de cultura de células. Após a adição de 75 µl de

polietilenimina linear (PEI) (1 mg/ml) (Polyscience, 23966), a mistura (DNA:PEI) foi incubada 15 min em temperatura ambiente. Depois disso, a mistura de transfecção foi adicionada gota a gota às células. 24 h após a transfecção, o meio-HEK293T foi substituído com meio Pro293a (Lonza, BE12-764Q) contendo 1% de penicilina/estreptomicina. Para a expressão ótima, as células transfectadas foram cultivadas a 37°C e CO<sub>2</sub> 7,5% por mais 96 a 120 h adicionais. O sobrenadante foi coletado e o anticorpo quimérico foi purificado por FPLC usando colunas de proteína A. A concentração do anticorpo foi determinada e a qualidade foi testada por SDS-PAGE.

**c. Teste de anticorpos monoclonais quiméricos contra CLDN6.**

15      Citometria de fluxo

Para testar as especificidades e afinidades de anticorpos monoclonais quiméricos específicos para CLDN6 que se ligam às células HEK293 estavelmente transfectadas com CLDN3, 4, 6 ou 9, respectivamente, e as linhagens de células tumorais que expressam CLDN6 endogenamente foram feitas análises por citometria de fluxo. Portanto, as células foram coletadas com tripsina/EDTA 0,05%, lavadas com tampão FACS (PBS contendo FCS 2% e azida de sódio 0,1%) e ressuspensas em tampão FACS a uma concentração de  $2 \times 10^6$

células/ml. 100 µl da suspensão celular foram incubados com o anticorpo apropriado nas concentrações indicadas durante 60 min a 4°C. Um anticorpo quimérico de reatividade cruzada (chimAB 5F2D2) foi utilizado para detectar a expressão de CLDN6 e CLDN9. Os anticorpos anti-claudina de camundongo disponíveis comercialmente anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) e anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) serviram como controles positivos, enquanto IgG1-capa humana (Sigma, I5154) serviu como controle negativo. As células foram lavadas três vezes com tampão FACS e incubadas durante 30 min a 4°C com Fc-gama de IgG de cabra anti-humano conjugada com APC (Dianova, 109-136-170) ou um anticorpo secundário específico IgG 1+2a+2b+3 anti-camundongo conjugado com APC (Dianova, 115-135-164), respectivamente. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão FACS. A ligação foi analisada por citometria de fluxo utilizando BD FACSArray.

#### CDC

A citotoxicidade dependente do complemento (CDC) foi determinada por medição do teor de ATP intracelular em células não lisadas após a adição de complemento humano às células alvo incubadas com anticorpos anti-CLDN6. Como um método analítico muito sensível, a reação de bioluminescência da luciferase é usada para medir ATP.

Neste ensaio, as células tipo selvagem NEC8 (positivas para CLDN6) e células NEC8 com CLDN6 reduzida (negativas para CLDN6) foram utilizadas, onde ambas foram estavelmente transduzidas com o constructo de expressão da luciferase.

5 As células foram coletadas com 0,05% de tripsina/EDTA e ajustadas até uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/ml em RPMI com meio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) contendo FCS a 10% (v/v).  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em uma placa PP de 96 poços brancos e incubadas durante 24 h a

10  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%. Após a incubação, 50  $\mu\text{l}$  de anticorpos monoclonais anti-CLDN6 quiméricos em 60% de RPMI (contendo HEPES 20 mM) e 40% de soro humano (*pool* de soro obtido a partir de seis doadores saudáveis) foram adicionados às células nas concentrações indicadas. 10  $\mu\text{l}$  de Triton X-100

15 8% (v/v) em PBS por poço foram adicionados aos controles de lise total, enquanto que 10  $\mu\text{l}$  de PBS por poço foram adicionados aos controles de células viáveis máximas e às amostras efetivas. Após uma incubação adicional de 80 min a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  a 5%, 50  $\mu\text{l}$  de mistura de luciferina (3,84 mg/ml

20 de D-luciferina, 0,64 U/ml de ATPase e 160 mM de HEPES em ddH<sub>2</sub>O) foram adicionados por poço. A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente durante 45 min. A bioluminescência foi medida utilizando um luminômetro

(Infinite M200, TECAN). Os resultados foram apresentados como unidades relativas de luz digital integrada (RLU).

A lise específica é calculada como:

$$\text{lise específica [\%]} = 100 - \left[ \frac{(\text{amostra} - \text{lise total})}{(\text{células viáveis max} - \text{lise total})} \times 100 \right]$$

5

Células viáveis máx: PBS 10 µl, sem anticorpo

Lise total: 10 µl de Triton X-100 8% (v/v) em PBS, sem anticorpo

#### ADCC

10 A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) foi determinada por medição do teor de ATP intracelular em células não lisadas após a adição de PBMC humano às células alvo incubadas com anticorpos anti-CLDN6. Como um método analítico muito sensível, a reação  
15 bioluminescente da luciferase é usada para medir ATP.

Neste ensaio, células tipo selvagem NEC-8 (positivas para CLDN6) e células NEC-8 com diminuição de expressão de CLDN6 (negativas para CLDN6) foram utilizadas, em que ambas foram estavelmente transduzidas com o constructo de  
20 expressão da luciferase. As células foram coletadas com 0,05% de tripsina/EDTA e ajustadas até uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/ml em RPMI com meio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) contendo FCS a 10% (v/v) e Hepes 20 mM.  $1 \times 10^4$

células foram semeadas em uma placa PP de 96 poços brancos e incubadas durante 4 h a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%.

PBMC foram isoladas de amostras de sangue de doadores humanos por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll Hypaque (GE Healthcare, 17144003). As PBMC contendo a interfase foram isoladas e as células foram lavadas duas vezes com PBS/EDTA (2 mM).  $1 \times 10^8$  PBMC foram semeadas em 50 ml de meio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) contendo 5% de soro humano inativado pelo calor (Lonza, US14-402E) e incubadas durante 2 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%.

4 h após a semeadura das células alvo (NEC-8) 25 µl de anticorpos monoclonais anti-CLDN6 quiméricos em PBS foram adicionados às células nas concentrações indicadas. As PBMC não aderentes, que se separaram em 2h de incubação dos monócitos aderentes, foram coletadas e ajustadas a  $8 \times 10^6$  células/ml de meio X-vivo 15. 25 µl desta suspensão de células foram adicionados às células alvo e aos anticorpos monoclonais anti-CLDN6 quiméricos. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%.

Após 24 h de incubação, 10 µl de Triton X-100 8% (v/v) em PBS por poço foram adicionados aos controles de lise total, enquanto que 10 µl de PBS por poço foram adicionados aos controles de células viáveis máximas e às amostras

efetivas. 50 µl de mistura de luciferina (3,84 mg/ml de D-luciferina, 0,64 U/ml de ATPase e HEPES 160 mM em ddH<sub>2</sub>O) foram adicionados por poço. A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente durante 30 min. A bioluminescência foi medida utilizando um luminômetro (Infinite M200, TECAN). Os resultados são apresentados como unidades relativas de luz digital integrada (RLU).

A lise específica é calculada como:

$$\text{lise específica [\%]} = 100 - \left[ \frac{(\text{amostra} - \text{lise total})}{(\text{células viáveis max} - \text{lise total})} \times 100 \right]$$

10

Células viáveis máx: PBS 10 µl, sem anticorpo

Lise total: 10 µl de Triton X-100 8% (v/v) em PBS, sem anticorpo.

#### **d. Resultados.**

15 Anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A mostraram forte ligação à CLDN6 humana, enquanto nenhuma ligação à CLDN3, 4 e 9 foi observada (Figura 11).

No que diz respeito à ligação à CLDN6 humana estavelmente expressa na superfície de células HEK293, os anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A e 89A apresentam valores de EC<sub>50</sub> muito baixos (450 a 600 ng/ml de EC<sub>50</sub>) e a saturação da ligação foi alcançada em

20

baixas concentrações. ChimAB 67A e 61D apresentaram valores de EC50 baixo (EC50 de 1000 ng/ml) e médio (EC50 de 2300 ng/ml), respectivamente (figura 12).

No que diz respeito à ligação de CLDN6 endogenamente expressa em células NEC8, anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A e 89A exibiram valores de EC50 muito baixos (EC50 de 600 a 650 ng/ml) e a saturação de ligação foi alcançada em concentrações baixas, enquanto que chimAB 61D e 67A apresentaram valores de EC50 médio (EC50 de 1700 ng/ml) e elevado (EC50 de 6100 ng/ml), respectivamente (Figura 13).

No que diz respeito à ligação de CLDN6 endogenamente expressa em células OV90, anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A e 89A exibiram valores de EC50 muito baixos (EC50 de 550 a 600 ng/ml) e a saturação da ligação foi alcançada em baixas concentrações. ChimAB 61D e 67A apresentaram valores de EC50 médios (EC50 de 1500 ng/ml e EC50 de 2300 ng/ml, respectivamente) (Figura 14).

Anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A apresentaram atividade CDC de maneira dose dependente em células NEC-8 (Figura 15).

Anticorpos monoclonais quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A exibiram atividade ADCC dose dependente em células NEC-8 e induziram ADCC mesmo em baixas



concentrações de anticorpo (Figura 16).

Estes resultados mostram claramente a especificidade destes anticorpos monoclonais quiméricos para CLDN6.

**Exemplo 8: Tratamento usando anticorpos monoclonais  
5    contra CLDN6.**

Tratamento Inicial

Para os tratamentos iniciais com anticorpos,  $2 \times 10^7$  células NEC8 em 200  $\mu$ l de meio RPMI (Gibco) foram inoculadas subcutaneamente no flanco de camundongos Nude-  
10 *Foxn1<sup>nu</sup>* atímicos. Cada grupo experimental consistiu de dez camundongos fêmeas de 6 a 8 semanas de idade. Três dias após a inoculação de células tumorais, 200  $\mu$ g de anticorpo monoclonal de murino purificado muMAB 89A foi aplicado durante sete semanas por alternância de injeções  
15 intravenosas e intraperitoneais duas vezes por semana. O grupo experimental tratado com PBS serviu como controle negativo. O volume tumoral ( $TV = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$ ) foi monitorado bissemanalmente. TV é expresso em  $\text{mm}^3$ , permitindo a construção de curvas de crescimento  
20 tumoral ao longo do tempo. Quando os tumores atingiram um volume maior do que 1500  $\text{mm}^3$ , os camundongos foram sacrificados.

Tratamentos avançados

Para os tratamentos com anticorpos de tumores xenoenxertados avançados,  $2 \times 10^7$  células NEC8 em 200  $\mu$ l de meio RPMI (Gibco) foram inoculadas subcutaneamente no flanco de camundongos Nude-*Foxn1*<sup>nu</sup> atímicos fêmeas com 6 a 8 semanas de idade. O volume tumoral (TV = (comprimento x largura<sup>2</sup>)/2) foi monitorado bissemanalmente. TV é expresso em mm<sup>3</sup>, permitindo a construção de curvas de crescimento tumoral ao longo do tempo. De 15 a 17 dias após a inoculação de células tumorais, os camundongos foram divididos em grupos de tratamento de oito animais por grupo com tamanhos de tumor homogêneos acima de 80 mm<sup>3</sup>. 200  $\mu$ g de anticorpos monoclonais de murino purificados muMAB 61D, 64A, 67A e 89A foram aplicados durante cinco semanas por alternância de injeções intravenosa e intraperitoneal duas vezes por semana. Os grupos experimentais tratados com PBS e um anticorpo inespecífico serviram como controles negativos. Quando os tumores atingiram um volume maior do que 1500 mm<sup>3</sup>, os camundongos foram sacrificados.

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento inicial usando camundongos enxertados com a linhagem de célula tumoral NEC8, os camundongos tratados com anticorpos monoclonais murinos muMAB 61D, 64A e 67A não mostraram qualquer crescimento tumoral mesmo após a interrupção da

imunoterapia (Figura 17).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento inicial usando camundongos enxertados com a linhagem de célula tumoral NEC8, muMAB 89A apresentou inibição do crescimento tumoral e nenhum tumor foi detectável nos camundongos tratados com muMAB89A no final do estudo (Figura 18).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de célula tumoral NEC8, muMAB 64A apresentou uma inibição do crescimento tumoral (Figura 19).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de célula tumoral NEC8, os camundongos tratados com muMAB 64A apresentaram sobrevida prolongada (Figura 20).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de célula tumoral NEC8, a inibição do crescimento tumoral foi alcançada com os anticorpos monoclonais murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A e 89A (Figura 21).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado usando camundongos enxertados com a linhagem de células tumorais NEC8, os camundongos tratados com o anticorpo CLDN6 específico muMAB 61D ou 67A mostraram sobrevida prolongada (Figura 22).

Em um modelo de xenoenxerto de tratamento avançado utilizando camundongos enxertados com células NEC8 tipo selvagem e células NEC8 com redução de expressão estável de CLDN6, muMAB 64A e 89A apenas mostraram um efeito terapêutico em camundongos enxertados com NEC8 tipo selvagem, mas não em camundongos enxertados com células NEC8 com redução de expressão de CLDN6, demonstrando especificidade à CLDN6 do anticorpo *in vivo* (Figura 23).

**Exemplo 9: Mapeamento de epítipo de alta resolução dos anticorpos monoclonais contra CLDN6.**

Os anticorpos monoclonais específicos para CLDN6 apresentam apenas ligação muito fraca (se houver) aos peptídeos lineares em estudos de mapeamento de epítipo por ELISA, o que implica que os seus epítopos são conformacionais. Para analisar a interação entre os anticorpos aqui descritos e CLDN6 na sua conformação nativa, mutagênese sítio direcionada em cultura de células de mamíferos foi usada como uma técnica de mapeamento de epítipo. A mutagênese de varredura de alanina dos aminoácidos 27 a 81 e 137 a 161 dentro do primeiro e segundo domínio extracelular, respectivamente, foi realizada. Após a expressão transitória em células HEK293T, mutantes de CLDN6 foram avaliados pelas suas capacidades de estarem ligados por anticorpos monoclonais específicos. A

ligação prejudicada de um anticorpo monoclonal específico a um mutante de CLDN6 sugere que o aminoácido modificado é um importante resíduo de contato e/ou conformacional. A ligação foi analisada por citometria de fluxo. Para 5 discriminar entre populações de células transfectadas e não transfectadas, as células foram cotransfectadas com um marcador de fluorescência.

Os resíduos de aminoácidos de CLDN6 que são importantes para a interação com anticorpos quiméricos 10 específicos para CLDN6 foram sistematicamente identificados por varredura de alanina. Mutações de alanina e glicina foram geradas por mutagênese sítio direcionada (GENEART AG, Alemanha). Para testar a ligação de anticorpos monoclonais quiméricos à CLDN6 tipo selvagem e seus mutantes, células 15 HEK293T foram transitoriamente transfectadas com o correspondente plasmídeo codificador de claudina e a expressão foi analisada por citometria de fluxo. A fim de diferenciar entre células transfectadas e não transfectadas, as células HEK293T foram cotransfectadas com 20 um marcador de fluorescência como um relator. 24 h após a transfecção, as células foram coletadas com 0,05% de tripsina/EDTA, lavadas com tampão FACS (PBS contendo FCS a 2% e azida de sódio a 0,1%) e ressuspensas em tampão FACS a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml. 100  $\mu$ l da suspensão

celular foram incubados com 10 µg/ml de anticorpo durante 45 min a 4°C. O camundongo comercialmente disponível anti-CLDN6 (R&D, MAB3656) foi utilizado como um controle para detectar a expressão de superfície celular de mutantes CLDN6. As células foram lavadas três vezes com tampão FACS e incubadas com Fc-gama de IgG de cabra anti-humana conjugada com APC (Dianova, 109-136-170) ou um anticorpo secundário específico IgG 1+2a+2b+3a anti-camundongo conjugado com APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 min a 4°C. As células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão FACS. A ligação na população de células transfectadas foi analisada por citometria de fluxo utilizando um BD FACSArray. Portanto, a expressão do marcador de fluorescência foi representada graficamente no eixo horizontal contra a ligação do anticorpo no eixo vertical. A intensidade de sinal média de um anticorpo monoclonal quimérico específico para CLDN6 ligado à CLDN6 mutante foi expressa como a porcentagem de ligação tipo selvagem. Os aminoácidos que são essenciais para a ligação não apresentaram ligação depois de serem modificados, enquanto que os aminoácidos que suportam a ligação apenas apresentaram ligação reduzida em comparação com o tipo selvagem.

Mapeamento de epítomos de alta resolução demonstrou

que os amino ácidos F35, G37, S39 e, possivelmente, T33 do primeiro domínio extracelular de CLDN6 são importantes para a interação com os anticorpos quiméricos específicos para CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A e 89A. O resíduo I40 é essencial para a ligação de chimAB 89A e contribui para a ligação de chimAB 61D e 67A. Além disso, L151 do segundo domínio extracelular de CLDN6 é importante para a interação com chimAB 67A (Figura 24).

## REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que é capaz de se ligar à CLDN6 **caracterizado** pelo fato de ser selecionado do grupo consistindo de (i) um anticorpo produzido por ou obtível a partir de um clone depositado sob o número de acesso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A) ou DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A), (ii) um anticorpo que é uma forma quimerizada ou humanizada do anticorpo em (i), (iii) um anticorpo que compreende a porção de ligação ao antígeno ou sítio de ligação a antígeno do anticorpo em (i) que compreende um conjunto de HCDRs e LCDRs selecionado do grupo que consiste em:

(a) um HCDR1 de sequência de aminoácido GYSFTGYT identificado dentro da SEQ ID NO: 34,

um HCDR2 de sequência de aminoácido INPYNGGT identificado dentro da SEQ ID NO: 34,

um HCDR3 de sequência de aminoácido ARDYGYVLDY identificado dentro da SEQ ID NO: 34,

um LCDR1 de sequência de aminoácido SSVSY identificado dentro da SEQ ID NO: 35,

um LCDR2 de sequência de aminoácido STS identificado dentro da SEQ ID NO: 35, e

um LCDR3 de sequência de aminoácido QQRSIYPPWT identificado dentro da SEQ ID NO: 35;

(b) um HCDR1 de sequência de aminoácido GYSFTGYT identificado dentro da SEQ ID NO: 36,



um HCDR2 de sequência de aminoácido INPYNGGT  
identificado dentro da SEQ ID NO: 36,

um HCDR3 de sequência de aminoácido ARDYGFVLDY  
identificado dentro da SEQ ID NO: 36,

um LCDR1 de sequência de aminoácido SSVSY identificado  
dentro da SEQ ID NO: 37,

um LCDR2 de sequência de aminoácido STS identificado  
dentro da SEQ ID NO: 37, e

um LCDR3 de sequência de aminoácido QQRSNYPPWT  
identificado dentro da SEQ ID NO: 37;

(c) um HCDR1 de sequência de aminoácido GYSFTGYT  
identificado dentro da SEQ ID NO: 38,

um HCDR2 de sequência de aminoácido INPYNGGI  
identificado dentro da SEQ ID NO: 38,

um HCDR3 de sequência de aminoácido ARDFGYVLDY  
identificado dentro da SEQ ID NO: 38,

um LCDR1 de sequência de aminoácido SSVSY identificado  
dentro da SEQ ID NO: 39,

um LCDR2 de sequência de aminoácido STS identificado  
dentro da SEQ ID NO: 39, e

um LCDR3 de sequência de aminoácido QQRSTYPPWT  
identificado dentro da SEQ ID NO: 39; e

(d) um HCDR1 de sequência de aminoácido GYSFTGYT  
identificado dentro da SEQ ID NO: 40,

um HCDR2 de sequência de aminoácido INPYNGGS  
identificado dentro da SEQ ID NO: 40,

um HCDR3 de sequência de aminoácido ARDYGYVFDY  
identificado dentro da SEQ ID NO: 40,

um LCDR1 de sequência de aminoácido SSVNY identificado dentro da SEQ ID NO: 41,

um LCDR2 de sequência de aminoácido STS identificado dentro da SEQ ID NO: 41, e

um LCDR3 de sequência de aminoácido QQRNYYPPWT identificado dentro da SEQ ID NO: 41.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de não ser substancialmente capaz de se ligar à CLDN9 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN9.

3. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado** pelo fato de não ser substancialmente capaz de se ligar à CLDN4 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN4 e/ou que não é substancialmente capaz de se ligar à CLDN3 associada com a superfície de uma célula que expressa CLDN3.

4. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de ser específico para CLDN6.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de ser capaz de se ligar a um epítopo localizado dentro de uma porção extracelular de CLDN6, em que a dita porção extracelular de CLDN6 compreende, preferencialmente, a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7.

6. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que CLDN6 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8.

7. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de ter uma ou mais das seguintes atividades:

- (i) morte de uma célula expressando CLDN6,
- (ii) inibição da proliferação de uma célula que expressa CLDN6,
- (iii) inibição da formação de colônias de uma célula que expressa CLDN6,
- (iv) mediação da remissão de tumores estabelecidos,
- (v) prevenção da formação ou re formação de tumores, e
- (vi) inibição da metástase de uma célula que expressa CLDN6, e/ou que de exibe uma ou mais funções efetoras imunes contra uma célula que carrega CLDN6 na sua conformação natural, em que a uma ou mais funções efetoras imunes são, preferencialmente, selecionadas do grupo consistindo de citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), indução de apoptose e inibição da proliferação, de preferência as funções efetoras são ADCC e/ou CDC.

8. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser um anticorpo monoclonal, quimérico, humano ou humanizado, ou um fragmento de um anticorpo.

9. Hibridoma, **caracterizado** pelo fato de ser depositado sob o N° de acesso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069

(GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A) ou DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A).

10. Conjugado, **caracterizado** pelo fato de compreender um anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 acoplado a um agente terapêutico, em que o agente terapêutico é, preferencialmente, uma toxina, um radioisótopo, um fármaco ou um agente citotóxico.

11. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender o anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e/ou o conjugado conforme definido na reivindicação 10, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Alça Extracelular 1			
CLDN6	(SEQ ID NO: 2)	MA SAGMQILGVLTLLGWNGLVSCALPMWKVTAFIGNSVIVQAQVWVEGLWMSCVVQSTG	60
CLDN9	(SEQ ID NO: 9)	MA STGLELLGMTLAVLWGLTGLVSCALPLWKVTAFIGNSVIVQAQVWVEGLWMSCVVQSTG	60
CLDN4	(SEQ ID NO: 10)	MA SMGLQVMGIALAVLWGLAVMLCCALPMWRVTAFIGNSVIVTSQTIWEGLMNMCVVQSTG	60
CLDN3	(SEQ ID NO: 11)	-MSMGLGITGTALAVLWGLTIVCCALPMWRVSFAFIGNSVITSQNIWEGLMNMCVVQSTG	59
* * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *			
Alça Extracelular 2			
CLDN6	(SEQ ID NO: 2)	QMCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLVALLFGLLVLAGAKCTTCVEEKDSKARIVLT	120
CLDN9	(SEQ ID NO: 9)	QMCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLVALLFGLLVITGAQCTTCVEDEGAKARIVLT	120
CLDN4	(SEQ ID NO: 10)	QMCKVYDSLLALPQDLQAARALVITIIVAALGVLLSVVGKCTNCLEDESAKAKTMIV	120
CLDN3	(SEQ ID NO: 11)	QMCKVYDSLLALPQDLQAARALIVVAILLAALFGLLVAGVGAQCTNCVQDDTAKAKITIV	119
***** : : : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *			
Alça Extracelular 2			
CLDN6	(SEQ ID NO: 2)	SGIVFVISGVLTLLIPVCWTAHAIIIRDFYNPLVAEAQKRELGAASLYLGWAAAGLLLLGGGL	180
CLDN9	(SEQ ID NO: 9)	AGVILLAGILVLIPLVPCWTAHAIIQDFYNPLVAEALKRELGAASLYLGWAAAGLLMLGGGL	180
CLDN4	(SEQ ID NO: 10)	AGVFLLAGLMVIVPVSVTAHNIQDFYNPLVAGQKREMGASLYVGWAAAGLLLLGGGL	180
CLDN3	(SEQ ID NO: 11)	AGVFLLAALLTLVPVSNANTIIRODFYNPVVPEAQKREMGAGLYVGWAAAGLLQLLGGAL	179
: : : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *			
LCCTCPSSGSGQPSHYMARYSTSAPAI SRGPSEYP-----TKNYV			220
CLDN6	(SEQ ID NO: 2)	LCCTCPPPQVERPRG--PRIGYSIPSRSGASGLD-----KRDYV	217
CLDN9	(SEQ ID NO: 9)	LCCNCPRT---DKPYSAK---YSAARSAASN-----YV	209
CLDN4	(SEQ ID NO: 10)	LCCSCPPR-----EKKYTATKVVSAPRSTGPGASLGTGYDRKDYV	220
CLDN3	(SEQ ID NO: 11)	***.***. . . . *	**

FIGURA 1



FIGURA 2A



FIGURA 2B

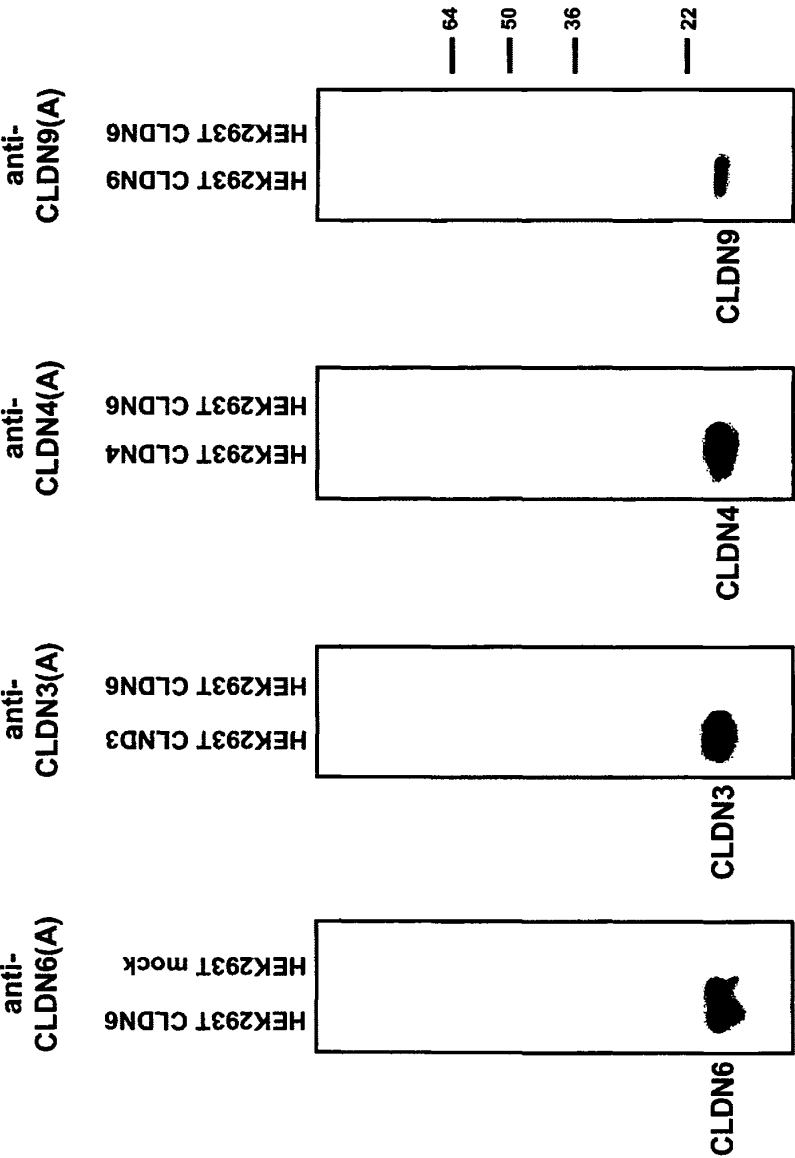
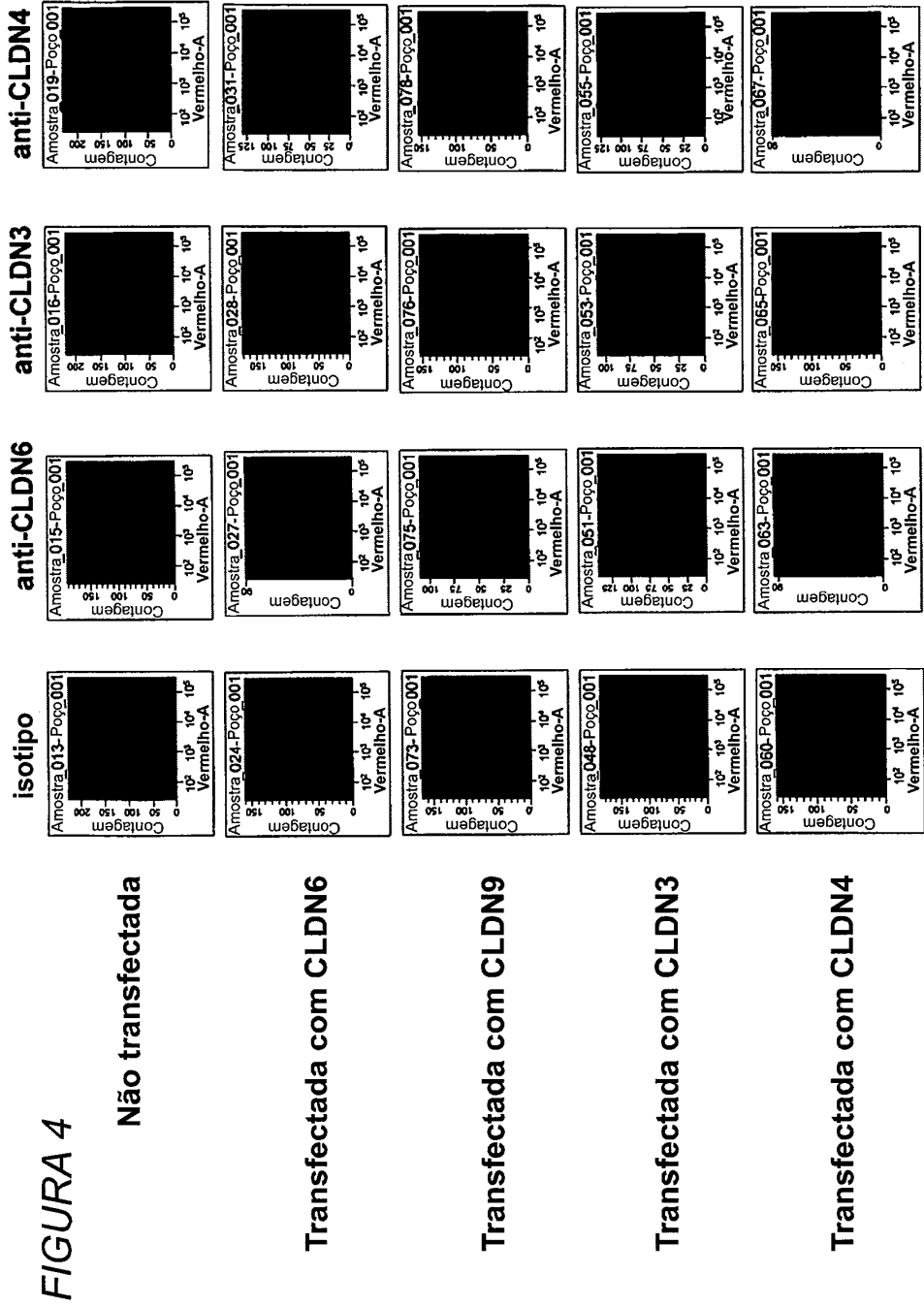


FIGURA 3





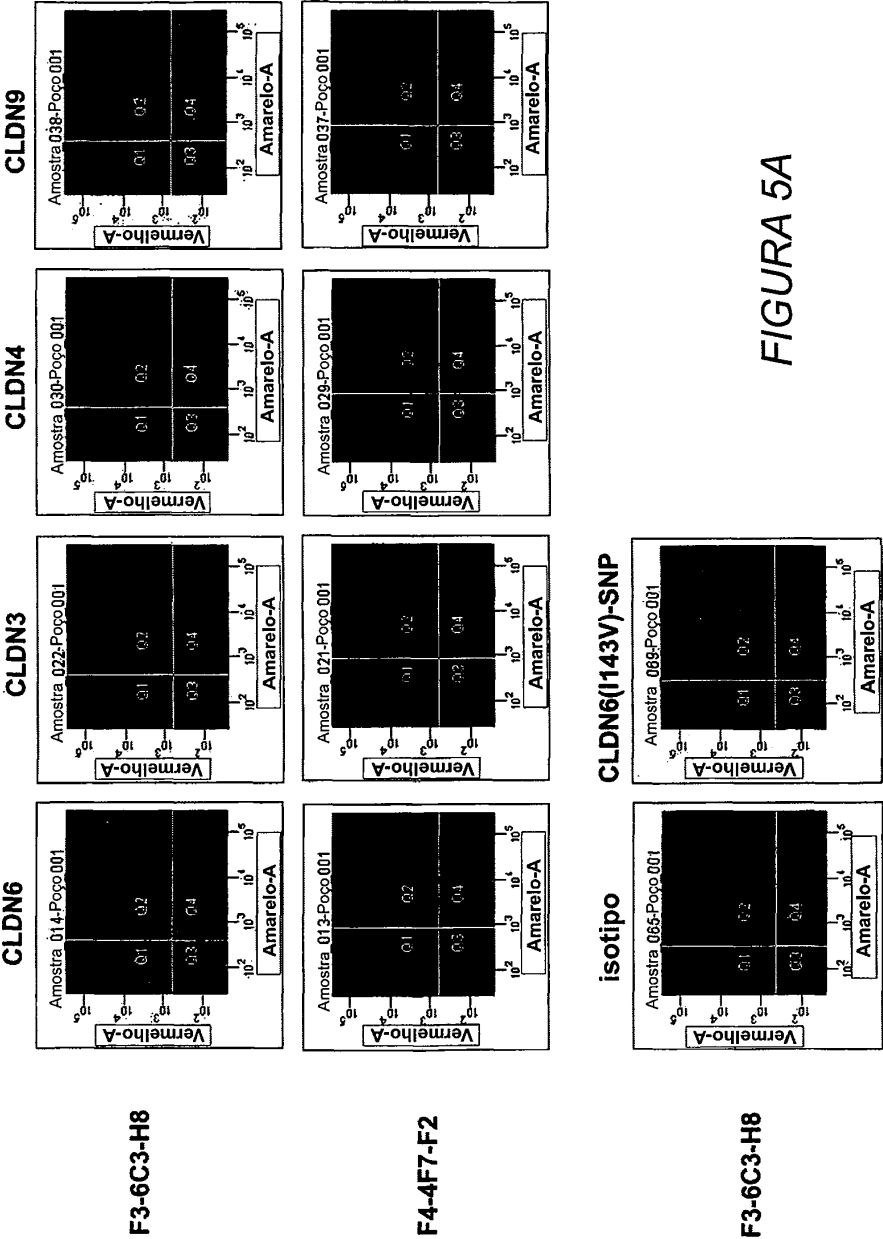


FIGURA 5A

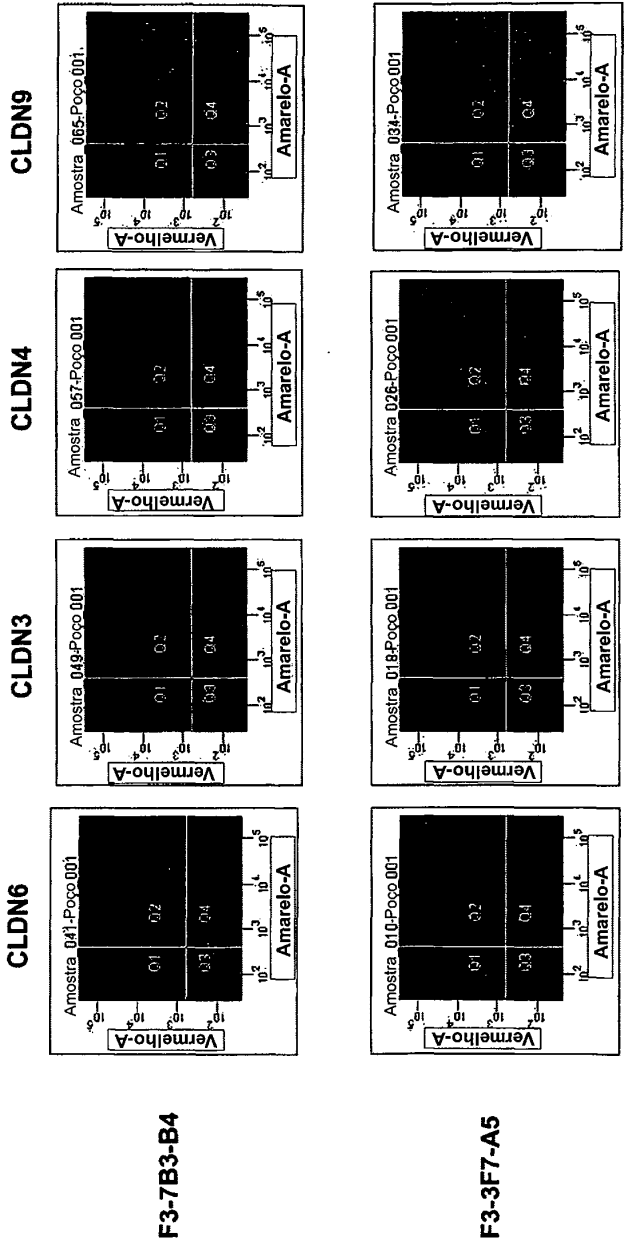


FIGURA 5B

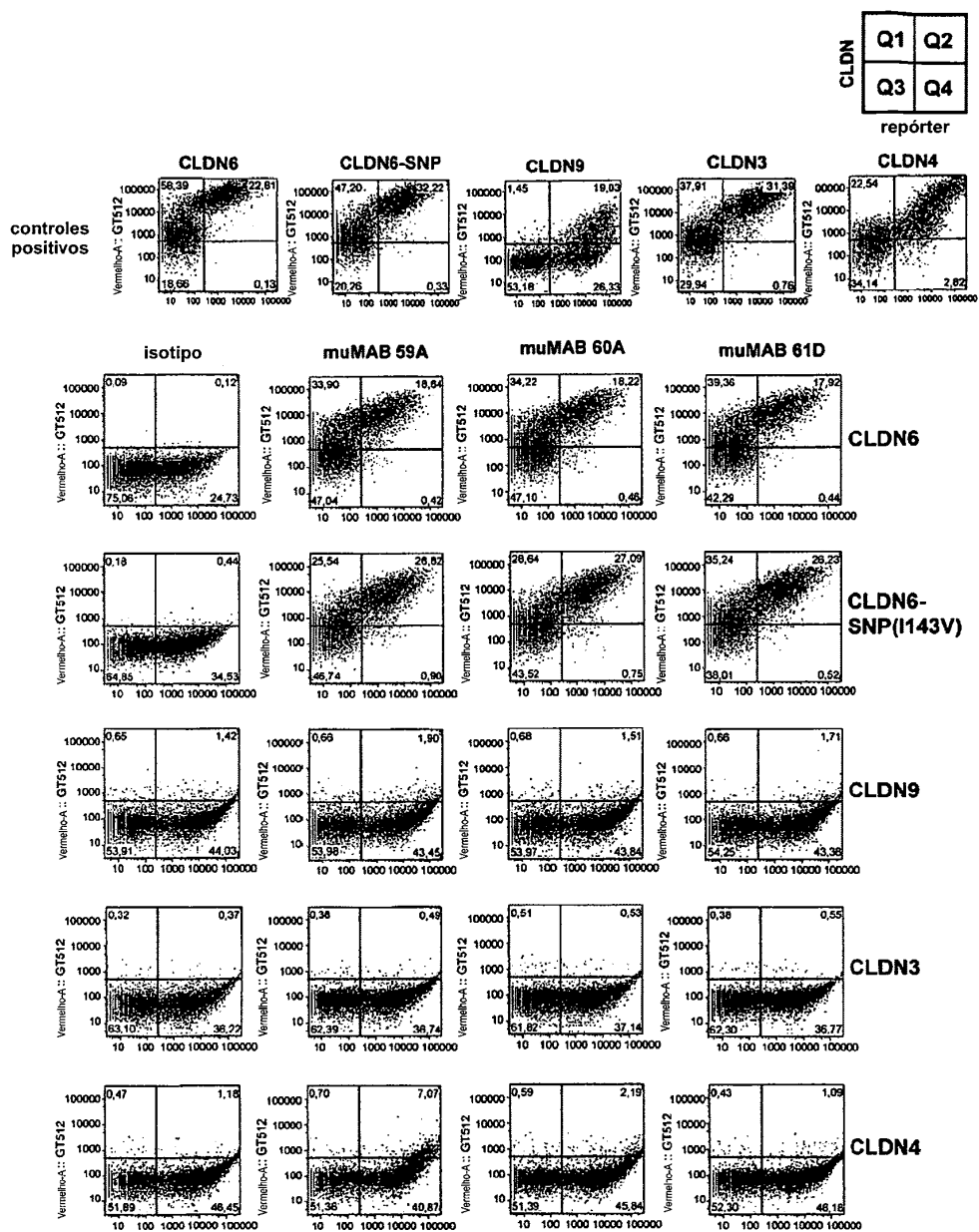


FIGURA 6

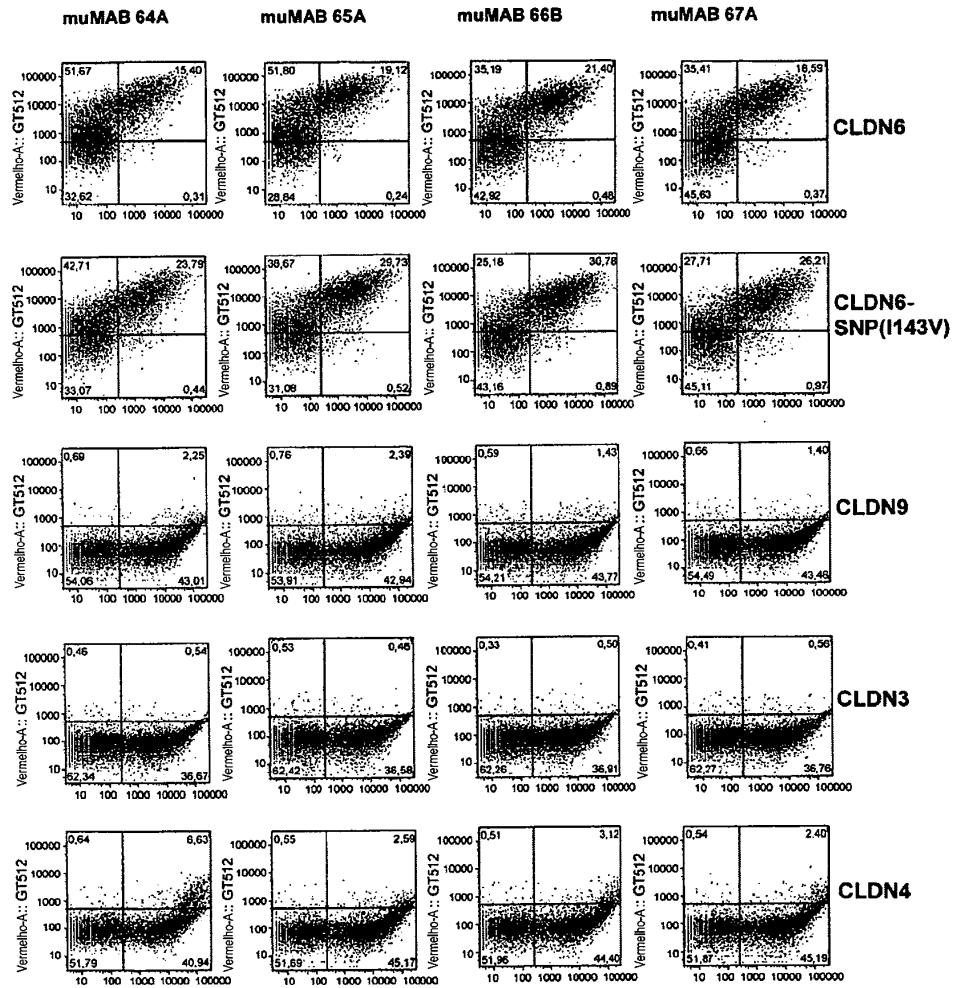


FIGURA 6

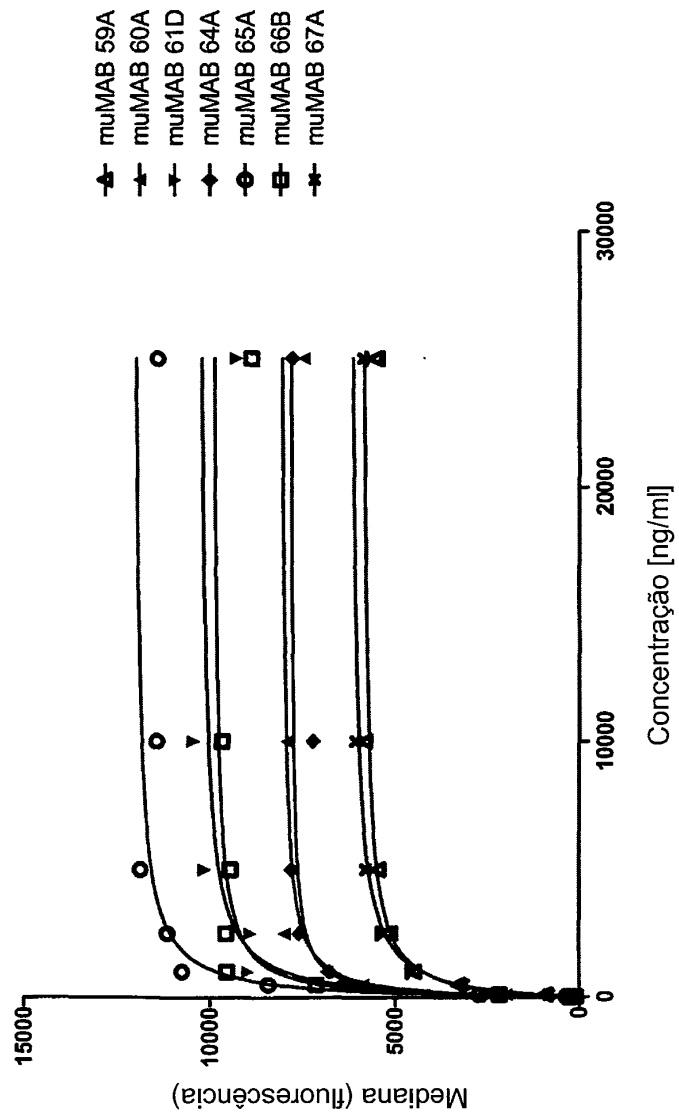


FIGURA 7

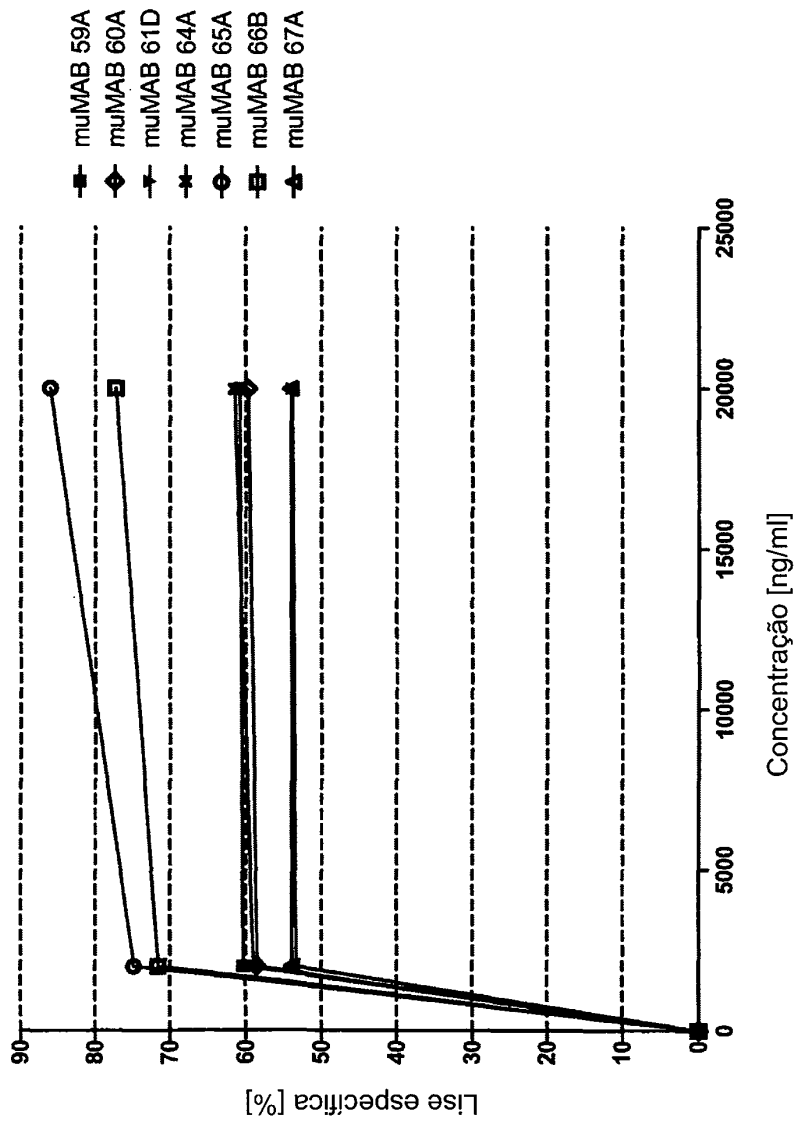


FIGURA 8

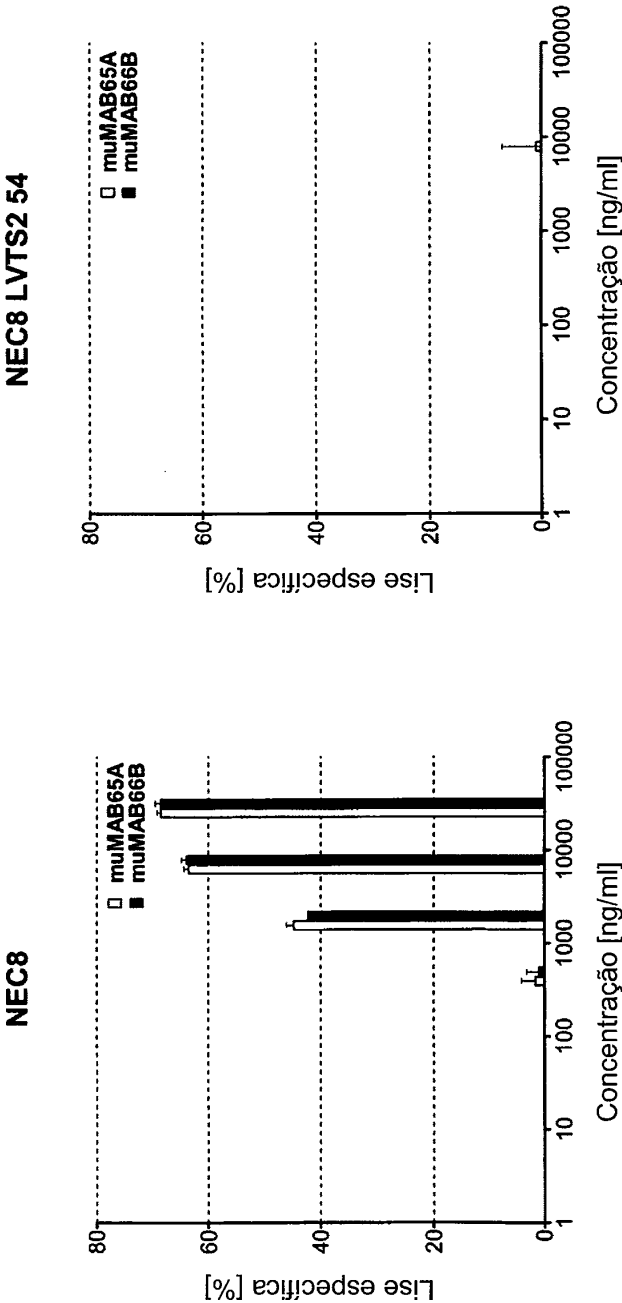


FIGURA 9

Barras de erro: Erro padrão das médias



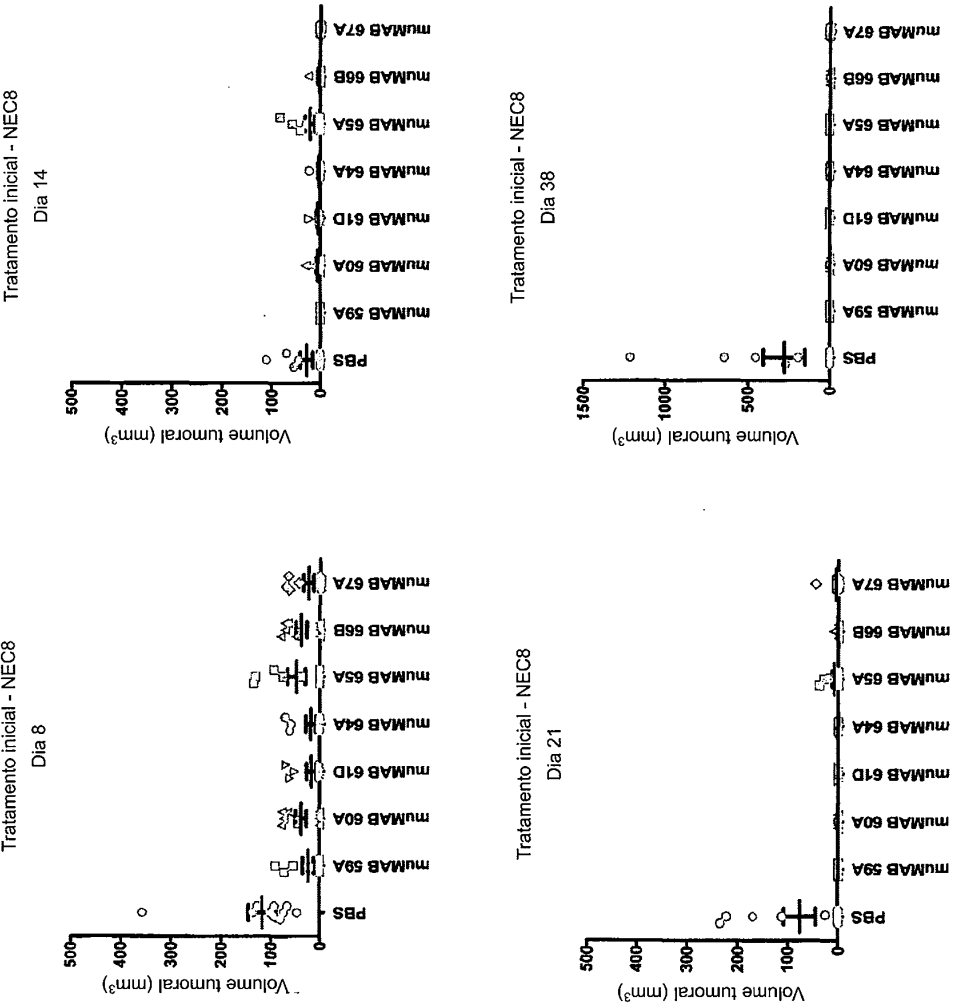


FIGURA 10

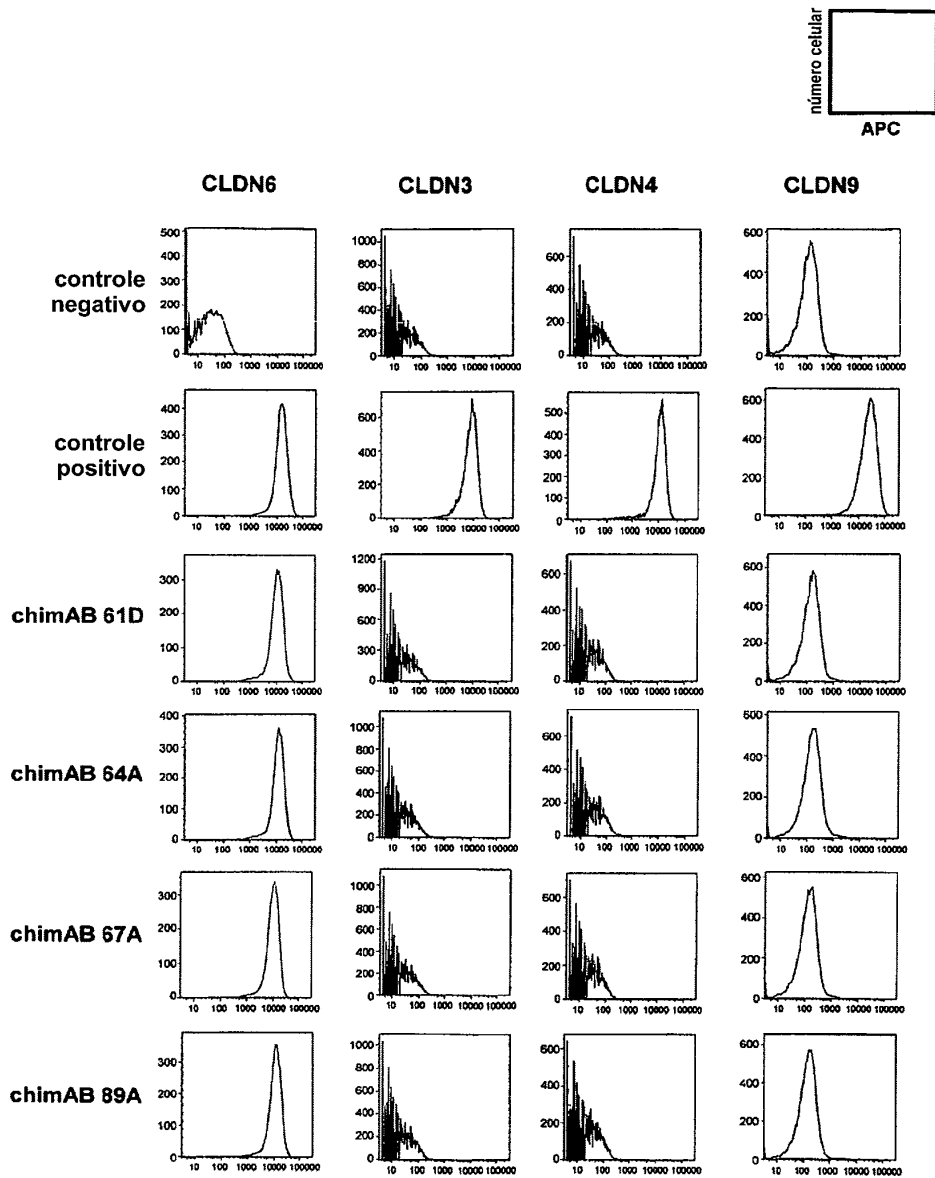
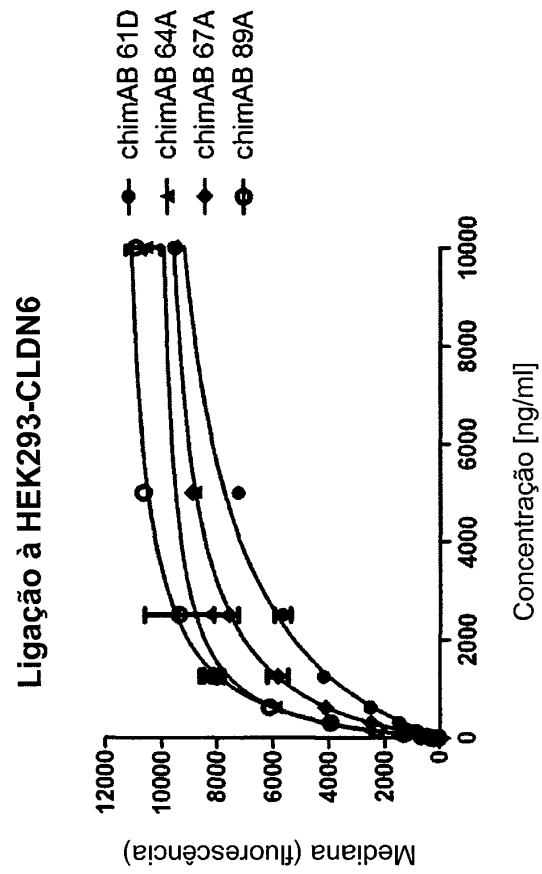


FIGURA 11

**FIGURA 12**

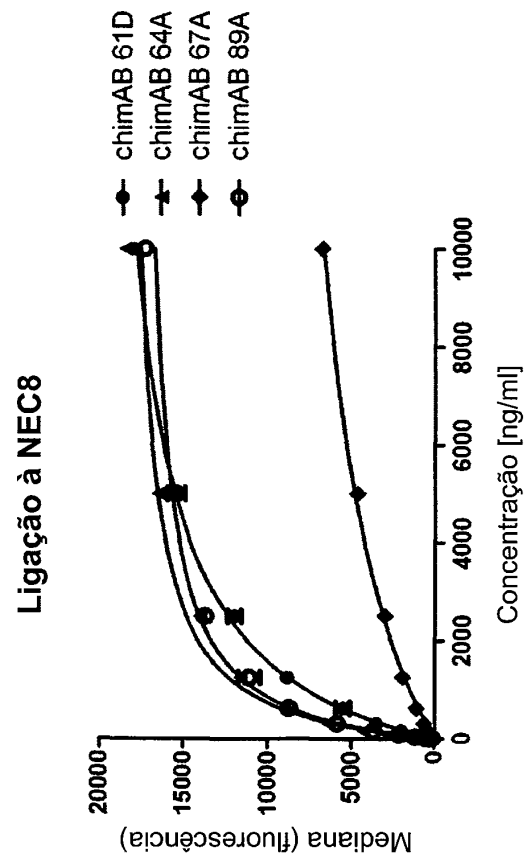


FIGURA 13

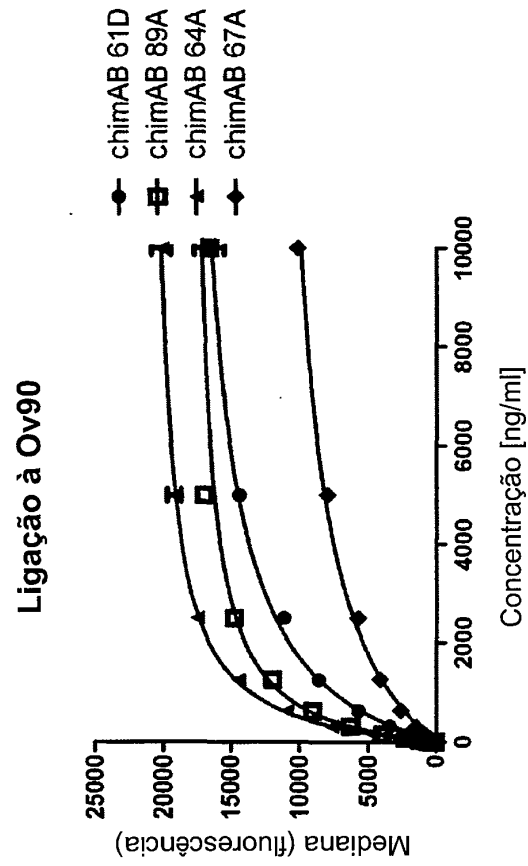


FIGURA 14

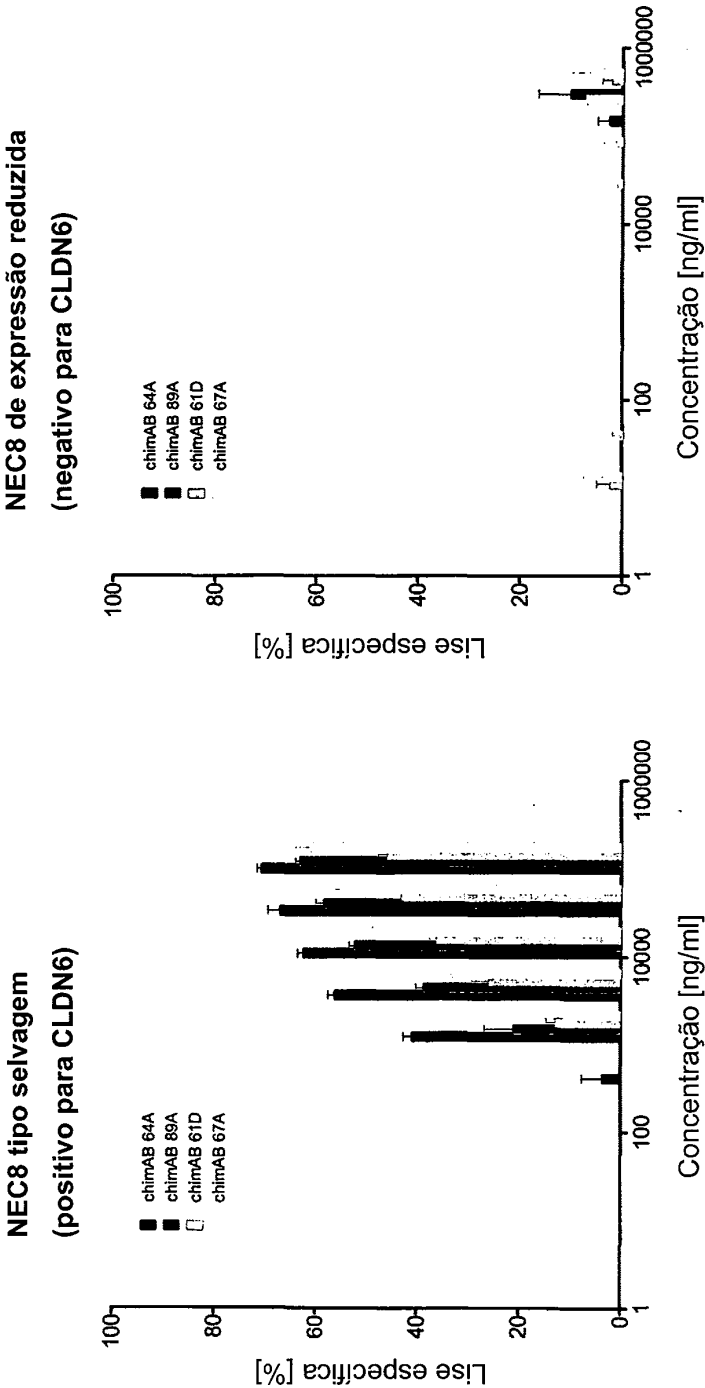


FIGURA 15

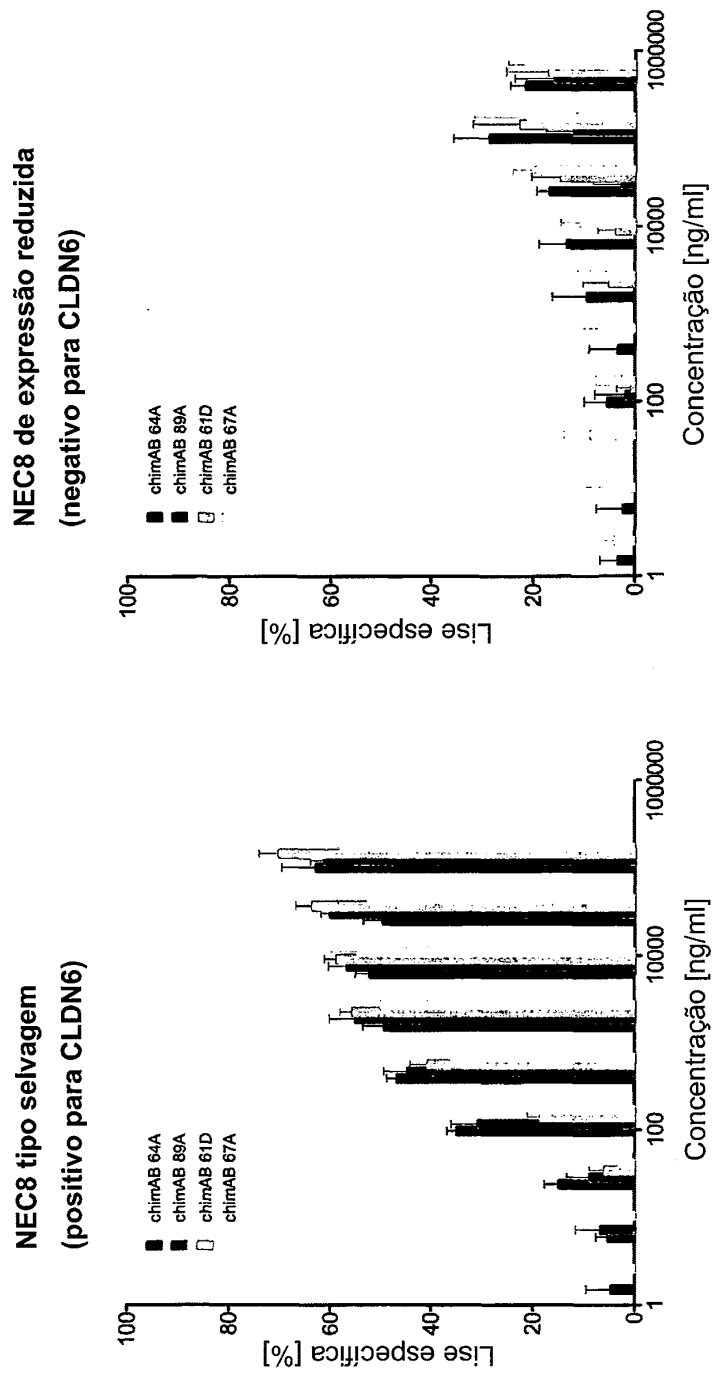


FIGURA 16

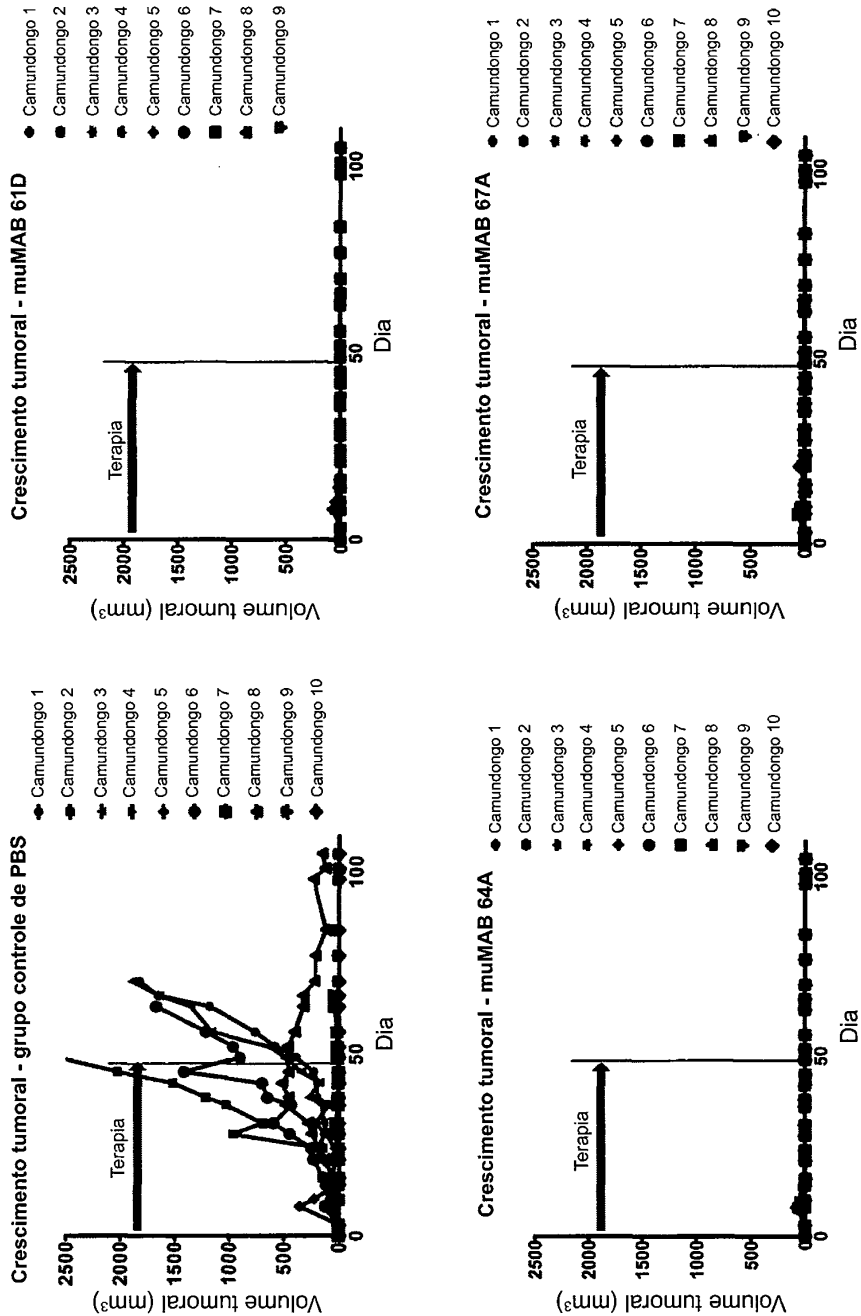


FIGURA 17



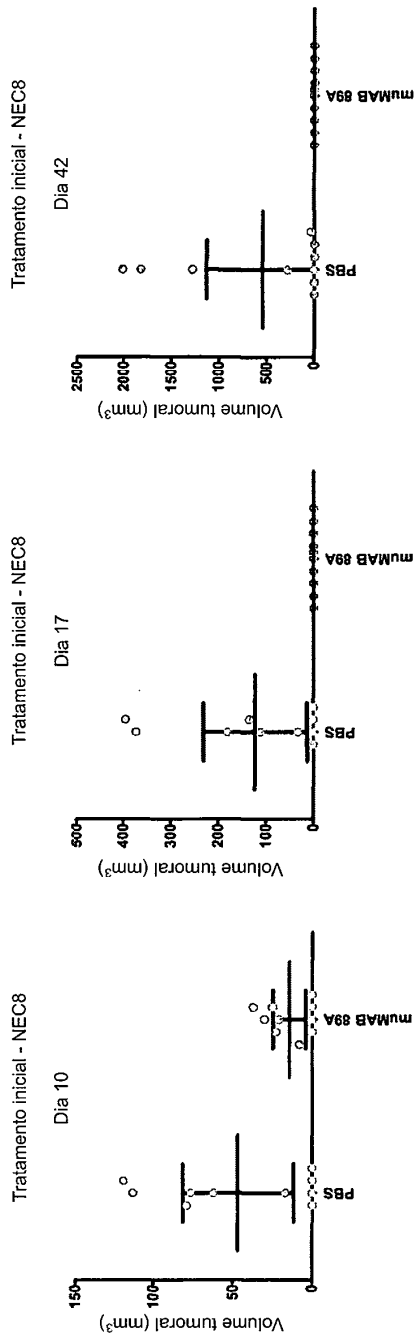


FIGURA 18A

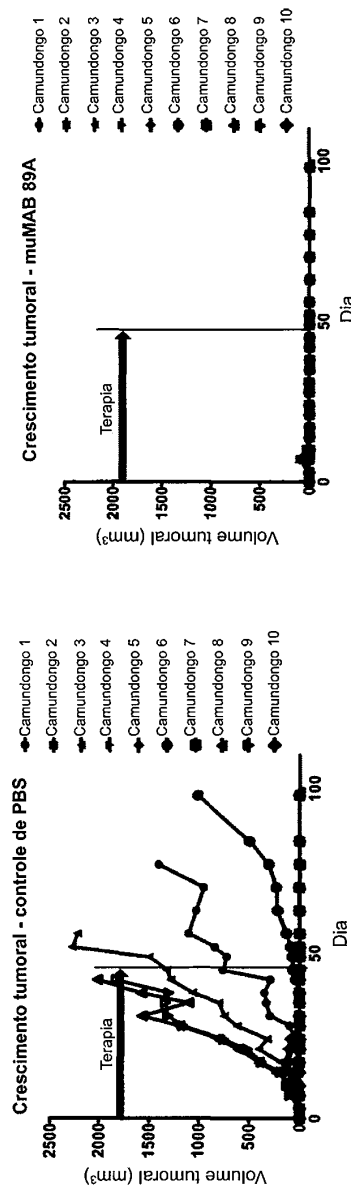


FIGURA 18B

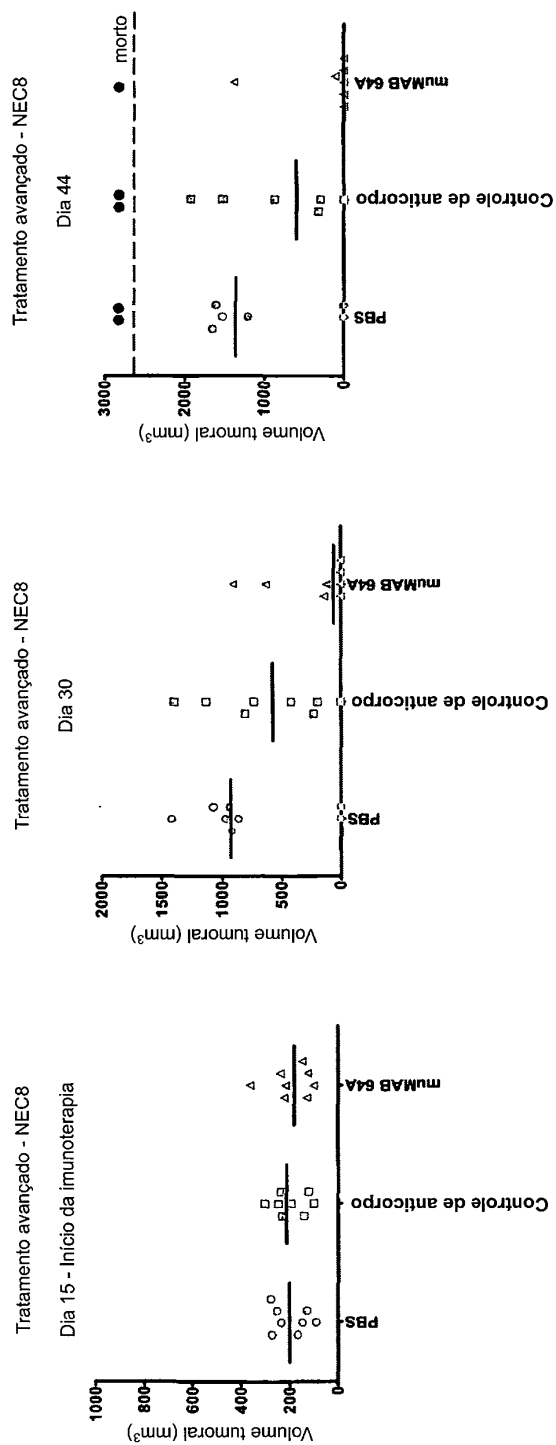


FIGURA 19

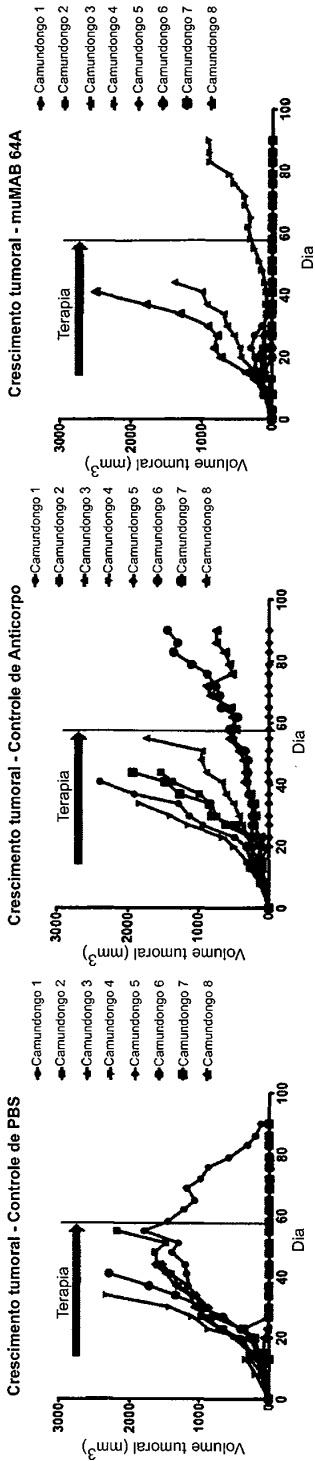


FIGURA 20A

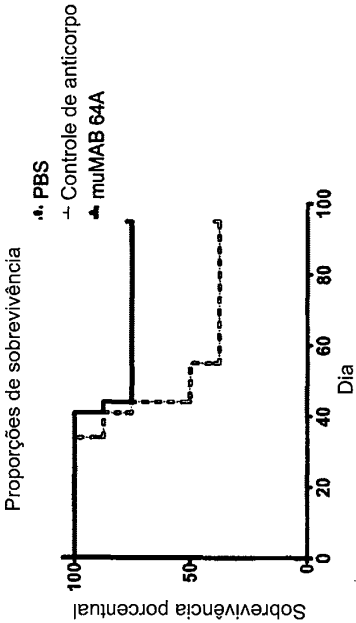


FIGURA 20B

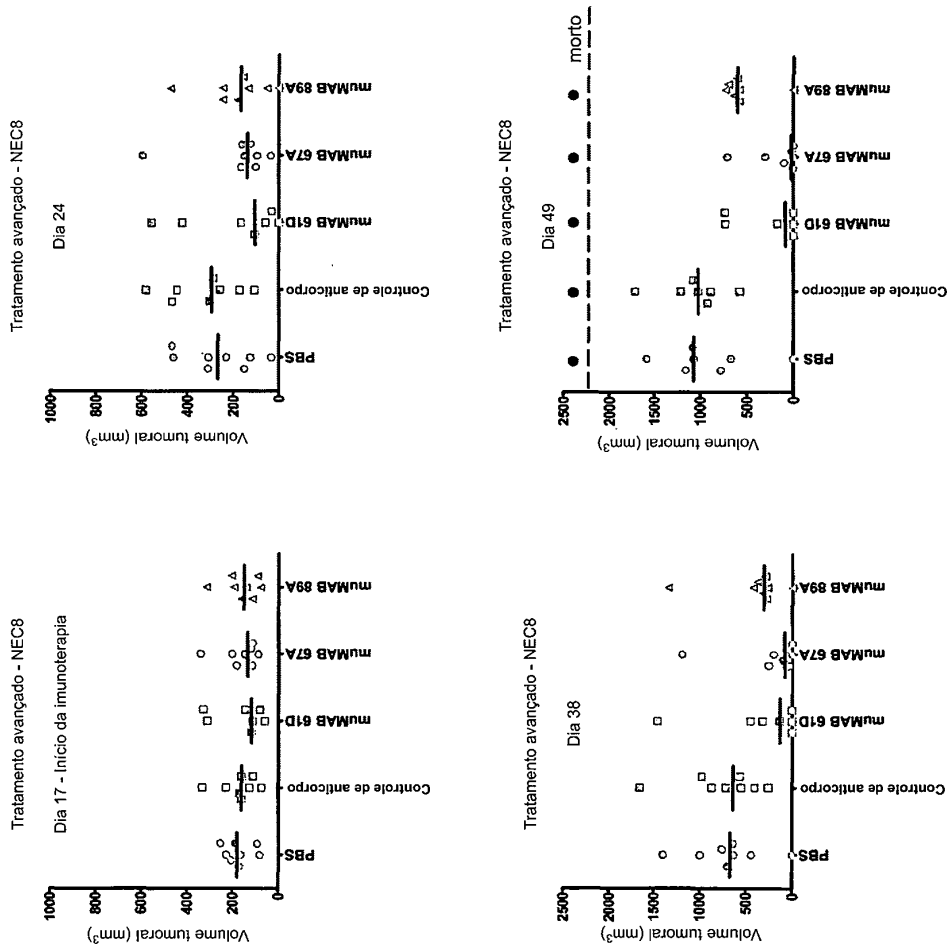


FIGURA 21

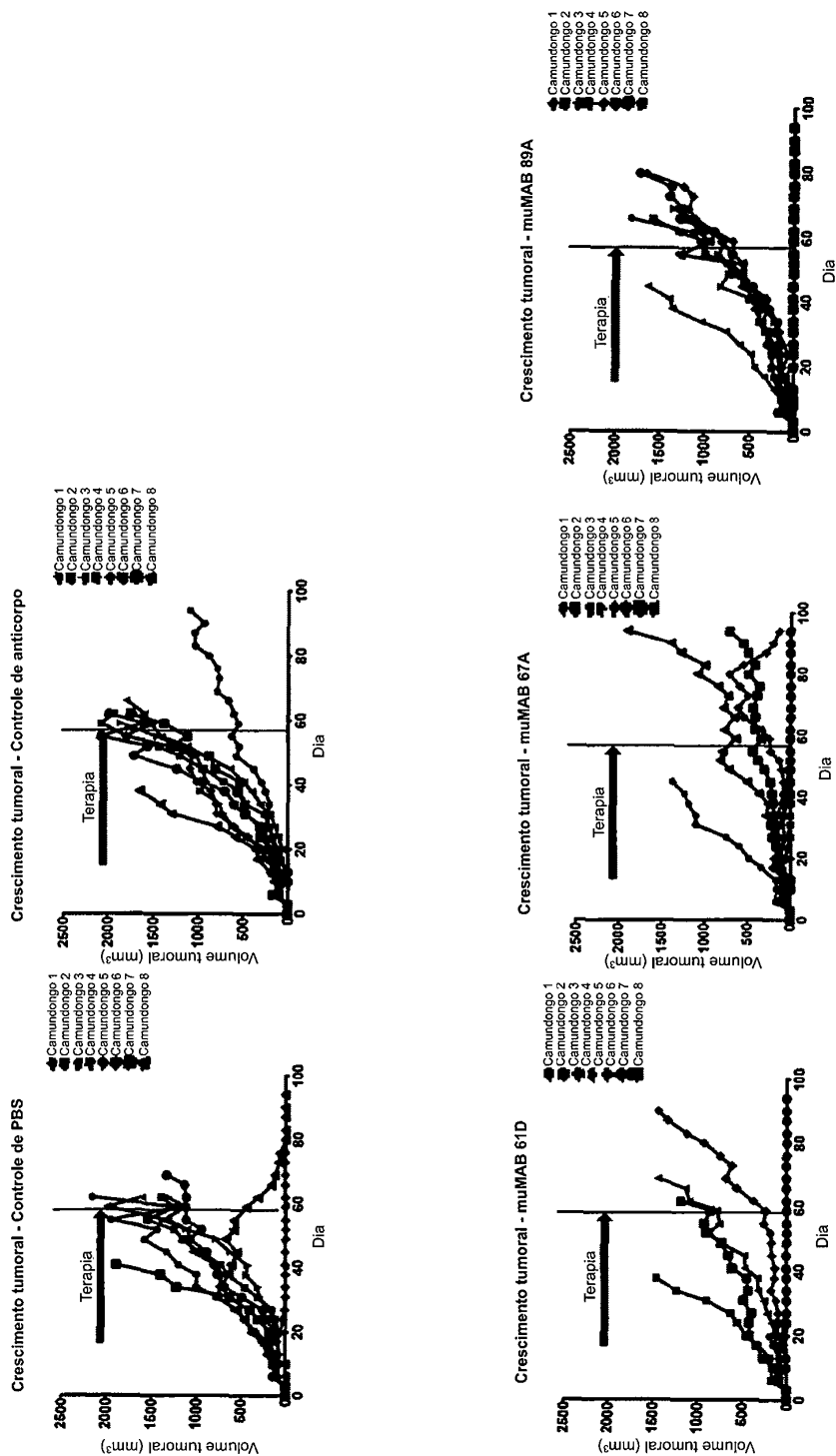


FIGURA 22A

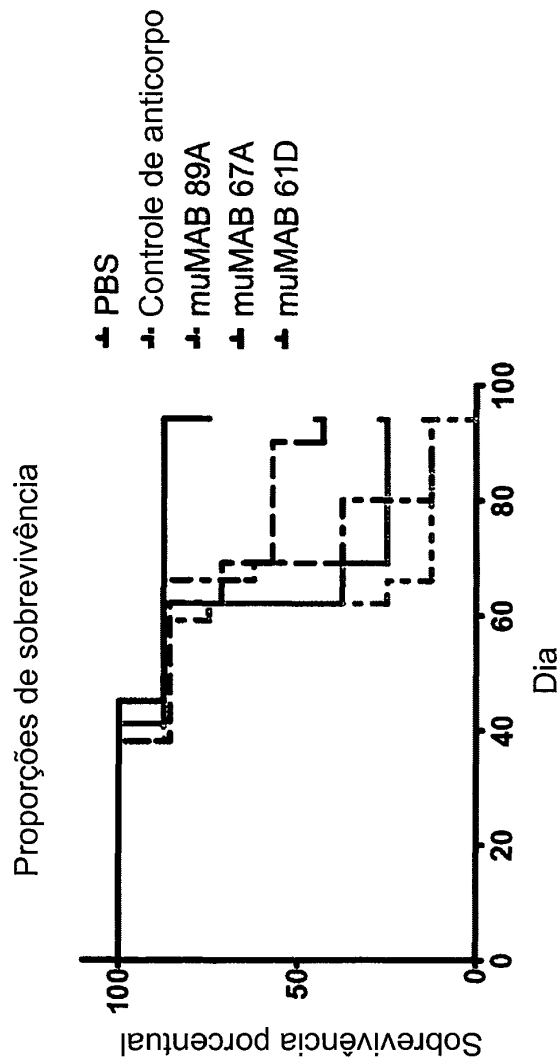


FIGURA 22B

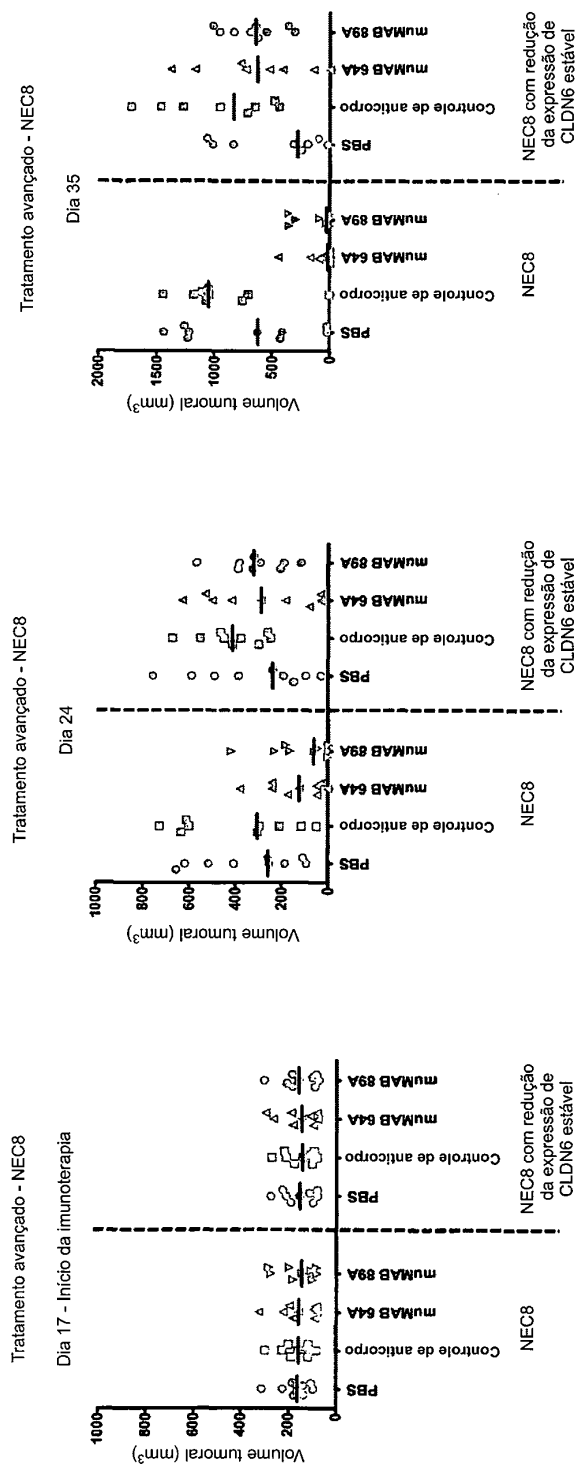


FIGURA 23

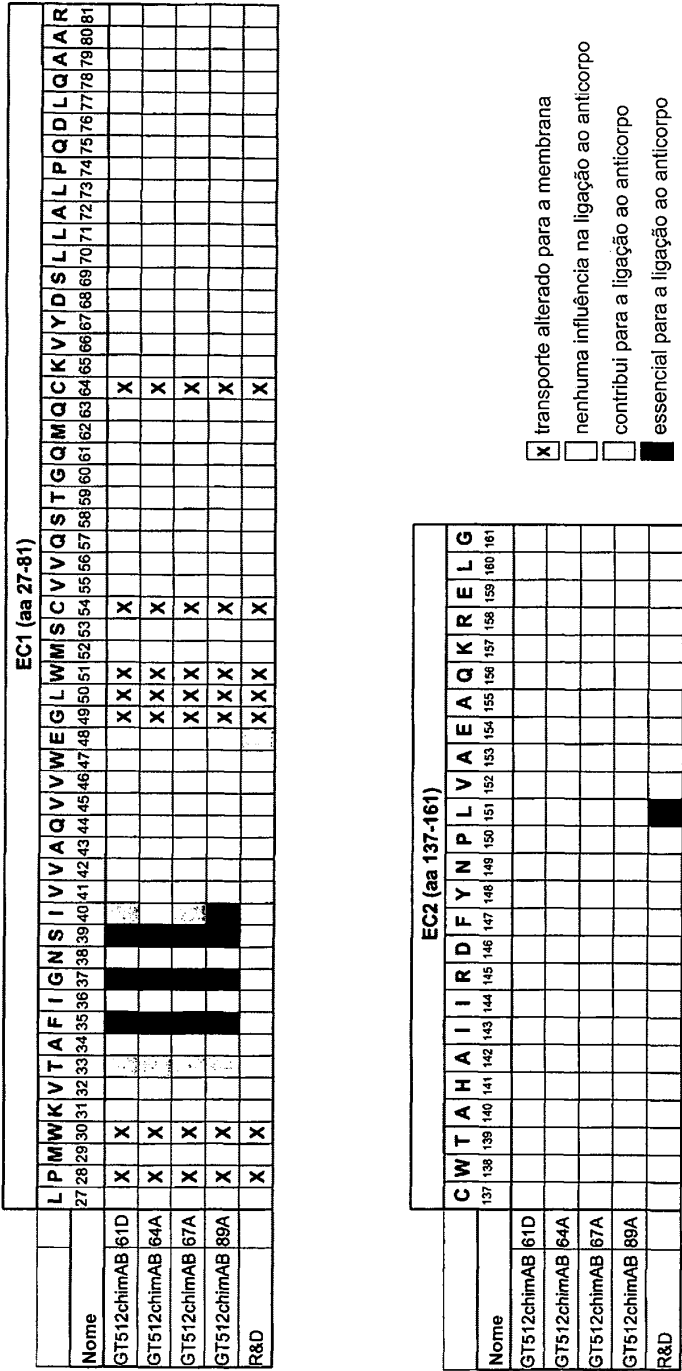


FIGURA 24



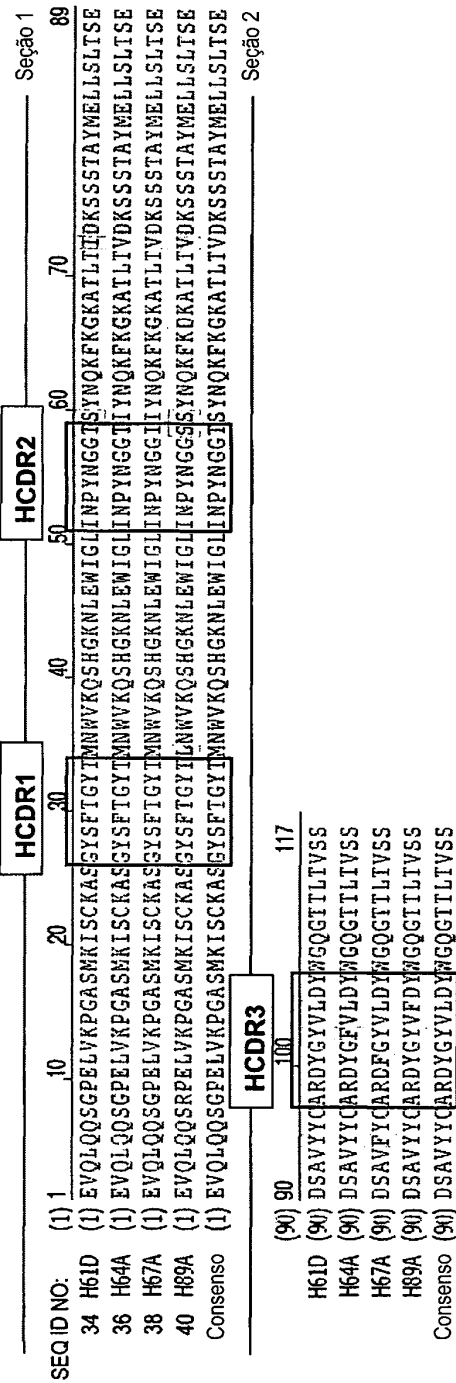


FIGURA 25

