



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

(21) BR 112021011014-3 A2



(22) Data do Depósito: 06/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 31/08/2021

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-CLAUDINA E USOS DESTES

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

(30) Prioridade Unionista: 07/12/2018 CN PCT/CN2018/119797.

(71) Depositante(es): ZLIP HOLDING LIMITED.

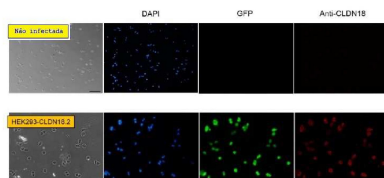
(72) Inventor(es): YONG LI; FENGLI SHAN; XU FANG; XINCHUAN DAI; SHOU LI; HONG LI; YUAN LIN; SHALI QI; YUEJING JIANG; JING LI; BING WAN; JAMES YAN; YUNPENG SU; VALERIA ROSA FANTIN.

(86) Pedido PCT: PCT CN2019123588 de 06/12/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/114480 de 11/06/2020

(85) Data da Fase Nacional: 07/06/2021

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI-CLAUDINA E USOS DESTES. São revelados nesse relatório descritivo anticorpos anti-Claudina 18.2 e composições farmacêuticas que os compreendem. Em algumas modalidades, também são descritos nesse relatório descritivo métodos de tratamento de um indivíduo que possui um câncer com um anticorpo anti-Claudina 18.2 e métodos de indução de efeito de morte celular com um anticorpo anti-Claudina 18.2.



**ANTICORPOS ANTI-CLAUDINA E USOS DESTES****REFERÊNCIA CRUZADA**

[001] Esse pedido reivindica prioridade para o Pedido do Tratado de Cooperação de Patentes N° PCT/CN2018/119797, depositado em 07 de dezembro de 2018, o referido pedido sendo incorporado nesse relatório descritivo por referência em sua totalidade para todas as finalidades.

**FUNDAMENTOS DA REVELAÇÃO**

[002] Cânceres gastroesofágicos e pancreáticos estão entre as malignidades com as maiores necessidades médicas não atendidas. O câncer gástrico (GC) é classificado como a terceira causa mais comum de mortes relacionadas ao câncer e a maior proporção de pacientes com câncer gástrico está distribuída na Ásia Oriental, em particular na Coreia, Mongólia, Japão e China. O câncer pancreático possui as maiores taxas de mortalidade de qualquer câncer nos países desenvolvidos e se espera que aumente tanto nos Estados Unidos quanto na China.

**SUMÁRIO DA REVELAÇÃO**

[003] São revelados nesse relatório descritivo, em certas modalidades, anticorpos anti-Claudina 18.2 e composições farmacêuticas que os compreendem. Em certas modalidades, também são descritos nesse relatório descritivo métodos de tratamento de um indivíduo que possui um câncer com um anticorpo anti-Claudina 18.2 e métodos de indução de efeito de morte celular com um anticorpo anti-Claudina 18.2.

[004] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2) que compreende uma metade da concentração efetiva máxima (EC<sub>50</sub>) que é menor do que uma EC<sub>50</sub> de anticorpo de referência

175D10, em que o anticorpo de referência 175D10 compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99.

[005] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2) que compreende pelo menos uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução.

[006] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2) que compreende pelo menos uma mutação em uma região Fc que confere citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC) aumentada, em que a ADCC aumentada é comparada com o anticorpo de referência 175D10 que compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99. Em algumas modalidades, a EC<sub>50</sub> do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 5 nM ou menor. Em algumas modalidades, a EC<sub>50</sub> do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1 nM, cerca de 0,5 nM, ou menor.

[007] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2) que compreende uma afinidade de ligação maior para CLDN18.2 em relação a uma afinidade de ligação do anticorpo de referência 175D10, em que o anticorpo de referência 175D10 compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99.

[008] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2

compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL), em que a região VH compreende: sequência CDR1 GFSLTSYX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>; em que X<sub>1</sub> é selecionado de N ou G; e X<sub>2</sub> é selecionado de Y ou H; sequência CDR2 VIWX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S; em que X<sub>3</sub> é selecionado de N ou P; X<sub>4</sub> é selecionado de T ou G; X<sub>5</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>6</sub> é selecionado de R ou N; X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I; X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A; e X<sub>10</sub> é selecionado de K ou M; e sequência CDR3 DX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>; em que X<sub>11</sub> é selecionado de S ou R; X<sub>12</sub> é selecionado de A ou R; X<sub>13</sub> é selecionado de M ou L; X<sub>14</sub> é selecionado de P ou A; X<sub>15</sub> é selecionado de A ou M; X<sub>16</sub> é selecionado de I ou D; X<sub>17</sub> é selecionado de P ou Y; X<sub>18</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>19</sub> está presente ou ausente e, se presente, é A; e X<sub>20</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SFGMH; em que X<sub>21</sub> está presente ou ausente e, se presente, é G; X<sub>22</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>23</sub> está presente ou ausente e, se presente, é T; X<sub>24</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; e X<sub>25</sub> está presente ou ausente e, se presente, é S; sequência CDR2 YISSGSX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>IYYX<sub>28</sub>DX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KG; em que X<sub>26</sub> é selecionado de S ou G; X<sub>27</sub> é selecionado de P ou S; X<sub>28</sub> é selecionado de V ou A; X<sub>29</sub> é selecionado de K ou T; e X<sub>30</sub> é selecionado de L ou V; e sequência CDR3 AX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>; em que X<sub>31</sub> é selecionado de G ou T; X<sub>32</sub> é selecionado de Y ou S; X<sub>33</sub> é selecionado de A ou Y; X<sub>34</sub> é selecionado de V ou Y; X<sub>35</sub> é selecionado de R ou Y; X<sub>36</sub> é selecionado de N ou G; X<sub>37</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>38</sub> é selecionado de L ou A; X<sub>39</sub> é selecionado de D ou L; X<sub>40</sub> é

selecionado de Y ou E; e X<sub>41</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1, sequência CDR2 VIWNTGATRYX<sub>7</sub>SX<sub>9</sub>LKS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; e X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13, sequência CDR2 VIWPGGNTNYX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>ALMS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N ou E; e X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 1, 7, 10 ou 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 3, 9, 12 ou 15. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5 ou 6; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 7, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 8, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 9. Em algumas modalidades, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 10, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 11, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 12. Em algumas modalidades, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 18, 21, 24-28, 31-35, 38

ou 39; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 19, 22, 29 ou 36; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 20, 23, 30 ou 37. Em algumas modalidades, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 21 ou 24-27; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 22; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 23. Em algumas modalidades, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 28 ou 31-34; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 29; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 30. Em algumas modalidades, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 35, 38 ou 39; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 36; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 37. Em algumas modalidades, a região VL compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 18, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 19, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 20.

[009] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo de comprimento total. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um fragmento de ligação. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um Fab' monovalente, um Fab2 divalente, um fragmento variável de cadeia única (scFv), um *diabody*, um *minibody*, um *nanobody*, um anticorpo de domínio único (sdAb), ou um anticorpo de camelídeo ou fragmento de ligação deste. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste, um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste, um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação deste, ou um anticorpo biespecífico ou fragmento de ligação deste.

[0010] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução. Em algumas modalidades, a mutação está em uma posição de aminoácido 60, 61 ou 62 de uma região VH, e em que as posições de aminoácidos correspondem à posição 60, 61 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40. Em algumas modalidades, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40. Em algumas modalidades, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 61 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em algumas modalidades, a mutação no resíduo de aminoácido N60 é para glutamina ou ácido glutâmico. Em algumas modalidades, a mutação no resíduo de aminoácido S61 é para isoleucina. Em algumas modalidades, a mutação no resíduo de aminoácido T62 é para alanina. Em algumas modalidades, a mutação está em uma posição de aminoácido 31 ou 32 de uma região VL, e em que as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 46, 52 ou 60. Em algumas modalidades, a mutação está na posição de aminoácido 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 46, 52 ou 60. Em algumas modalidades, a mutação no resíduo de aminoácido N31 é para ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em algumas modalidades, a mutação no resíduo de aminoácido S32 é para leucina, valina ou isoleucina. Em algumas modalidades, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 modificado em relação para o anticorpo de referência 175D10.

[0011] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de

identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 40-43 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 44. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 45 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 46-50. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 51 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 52-56. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 57-59 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 60-62. Em algumas modalidades, o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região CH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 63 e uma região CL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 64.

[0012] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado ou

fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 65-68 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 69-73. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 74-76 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 77-80. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 81-84 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 85-88. Em algumas modalidades, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 89-92 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 93-97.

[0013] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgM.

[0014] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG2.

[0015] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG1.

[0016] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma ou mais mutações na região FC. Em algumas modalidades, as (uma ou mais) mutações compreendem uma mutação na posição de aminoácido S239, posição de aminoácido I332, posição de aminoácido F243, posição de aminoácido R292, posição de aminoácido Y300, posição de aminoácido V305, posição de aminoácido P396 ou uma combinação destas. Em algumas modalidades, uma ou mais mutações na região FC conferem ADCC aumentada ao anticorpo de referência 175D10. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 possui uma atividade de citotoxicidade complemento-dependente (CDC), comparado com o anticorpo de referência 175D10.

[0017] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 é ainda conjugado a uma carga útil. Em algumas modalidades, a carga útil é uma auristatina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o derivado de auristatina é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o derivado de auristatina é monometil auristatina F (MMAF).

[0018] Em algumas modalidades, a proporção de fármaco-para-anticorpo (DAR) é cerca de 2, cerca de 3, ou cerca de 4.

[0019] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compartilha um epitopo de ligação com o anticorpo de referência 175D10.

[0020] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 possui uma atividade de ligação cruzada com proteína CLDN18.2 de camundongo e de *Cynomolgus*.

[0021] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2) que se liga especificamente a uma isoforma de CLDN18.2. Em

algumas modalidades, a isoforma de CLDN18.2 é uma isoforma expressa na linhagem de células SNU620.

[0022] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um polímero de ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo.

[0023] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um vetor que compreende um polímero de ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo.

[0024] É revelada nesse relatório descritivo, em certas modalidades, uma composição farmacêutica que compreende: um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo; e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração sistêmica. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é formulada para administração parenteral.

[0025] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um método de tratamento de um indivíduo que possui um câncer que é caracterizado por uma superexpressão de proteína CLDN18.2, que compreende: administração ao indivíduo de um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo ou uma composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo tratando, dessa forma, o câncer no indivíduo. Em algumas modalidades, o câncer é um câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer gástrico. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer pancreático. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer esofágico ou colangiocarcinoma.

Em algumas modalidades, o câncer é câncer de pulmão ou câncer ovariano. Em algumas modalidades, o método ainda compreende a administração ao indivíduo de um agente terapêutico adicional. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional compreende um agente quimioterápico, um agente imunoterápico, um agente terapêutico direcionado, um agente terapêutico à base de hormônio, um agente terapêutico à base de célula-tronco ou radiação. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são administrados simultaneamente. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são administrados sequencialmente. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado antes do anticorpo anti-CLDN18.2. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado depois da administração do anticorpo anti-CLDN18.2. Em algumas modalidades, o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são formulados como dosagens separadas. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[0026] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um método de indução de efeito de morte celular, que compreende: o contato de diversas células com um anticorpo anti-CLDN18.2 que compreende uma carga útil por um tempo suficiente para internalizar o anticorpo anti-CLDN18.2 e, dessa forma, induzir o efeito de morte celular. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, a carga útil compreende um maitansinóide, uma auristatina, um taxóide, uma caliqueamicina, uma duocarmicina, uma amatoxina, ou um

derivado destes. Em algumas modalidades, a carga útil compreende uma auristatina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, a carga útil é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, a carga útil é monometil auristatina F (MMAF). Em algumas modalidades, a célula é uma célula de câncer. Em algumas modalidades, a célula é de um câncer gastrointestinal. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer gástrico. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer pancreático. Em algumas modalidades, o câncer gastrointestinal é um câncer esofágico ou colangiocarcinoma. Em algumas modalidades, a célula é de um câncer de pulmão ou um câncer ovariano. Em algumas modalidades, o método é um método *in vitro*. Em algumas modalidades, o método é um método *in vivo*. Em algumas modalidades, o indivíduo é um humano.

[0027] É revelado nesse relatório descritivo, em certas modalidades, um kit que compreende um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo, um vetor descrito nesse relatório descritivo, ou uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[0028] Vários aspectos da revelação são apresentados com particularidade nas reivindicações em anexo. Uma melhor compreensão das características e vantagens da presente revelação será obtida por referência à descrição detalhada seguinte que apresenta modalidades ilustrativas, nas quais os princípios da revelação são utilizados, e aos desenhos que a acompanham, dos quais:

[0029] A Fig. 1 ilustra a expressão modificada

geneticamente de CLDN18.2 em células HEK293.

[0030] A Fig. 2 ilustra sequência de DNA de CLDN18.2 humana.

[0031] A Fig. 3 ilustra ECL1 de DNA de CLDN18.2.

[0032] As Fig. 4A-Fig. 4C ilustram curvas de ligação dose-dependente de anticorpos anti-CLDN18.2 gerados em camundongo purificados em células CHO-CLDN18.2. Anticorpos exibiram a maior ligação máxima (Fig. 4A), uma ligação máxima maior (Fig. 4B) e uma ligação máxima similar ou mais fraca (Fig. 4C), comparada com aquela de 175D10.

[0033] As Fig. 5A-Fig. 5B ilustram a ligação de anticorpos à linhagem de células de câncer gástrico SNU601 (Fig. 5A) e SNU620 (Fig. 5B). A numeração "1", "2", "3" e "4" indicam 282A12, 175D10, 101C6 e controles de isótipo, respectivamente.

[0034] As Fig. 6A-Fig. 6D ilustram 364D1A7 e 413H9F8 quiméricos que se ligam especificamente à linhagem de células CHO-CLDN18.2. a Fig. 6A e a Fig. 6B ilustram as curvas de ligação de 364D1A7 quimérico em linhagens de células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2. a Fig. 6C e a Fig. 6D ilustram as curvas de ligação de 413H9F8 quimérico em linhagens de células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2. A linhagem de células CHO-CLDN18.1 foi utilizada para experimentos mostrados na Fig. 6A e na Fig. 6C e a linhagem de células CHO-CLDN18.2 foi utilizada para experimentos mostrados na Fig. 6B e na Fig. 6D. Anticorpos 175D10 quiméricos e paternos servem como controles.

[0035] As Fig. 7A-Fig. 7D ilustram a ligação dose-dependente de variantes de 282A12F3 quimérico à linhagem de células CHO-CLDN18.2. A Fig. 7A e a Fig. 7C mostram as curvas

de ligação do anticorpo quimérico (xi282A12F3) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (282A12F3-VH-N60Q e 282A12F3-VH-N60E) na linhagem de células CHO-CLDN18.1. A Fig. 7B e a Fig. 7D mostram as curvas de ligação do anticorpo quimérico (xi282A12F3) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (282A12F3-VH-N60Q e 282A12F3-VH-N60E) na linhagem de células CHO-CLDN18.2.

[0036] As Fig. 8A-Fig. 8D ilustram a ligação dose-dependente de variantes de 413H9F8 quimérico às linhagens de células CHO-CLDN18.2. A Fig. 8A e a Fig. 8C mostram a curva de ligação de anticorpo murídeo (413H9F8), anticorpo quimérico (xi413H9F8) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (413H9F8-VL-N31E, 413H9F8-VL-S32L e 413H9F8-VL-S32V) na linhagem de células CHO-CLDN18.1. A Fig. 8B e a Fig. 8D mostram a curva de ligação de anticorpo murídeo (413H9F8), anticorpo quimérico (xi413H9F8) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (413H9F8-VL-N31E, 413H9F8-VL-S32L e 413H9F8-VL-S32V) na linhagem de células CHO-CLDN18.2.

[0037] As Fig. 9A-Fig. 9D ilustram a ligação dose-dependente de variantes de 364D1A7 quimérico às linhagens de células CHO-CLDN18.2. A Fig. 9A e a Fig. 9C mostram as curvas de ligação de anticorpo murídeo (364D1A7), anticorpos quiméricos (xi364D1A7) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (364D1A7-VL-N31E, 364D1A7-VL-S32L e 364D1A7-VL-S32V) na linhagem de células CHO-CLDN18.1. A Fig. 9B e a Fig. 9D mostram as curvas de ligação de anticorpo murídeo (364D1A7), anticorpos quiméricos (xi364D1A7) e anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes (364D1A7-VL-N31E, 364D1A7-VL-S32L e 364D1A7-VL-S32V) na linhagem de células

CHO-CLDN18.2.

[0038] As Fig. 10A-Fig. 10B ilustram ligação dose-dependente de variantes de 357B8F8 quimérico à linhagem de células CHO-CLDN18.2. a Fig. 10A mostra as curvas de ligação de anticorpos quiméricos 357B8F8 com sítios de PTM mutantes na linhagem de células CHO-CLDN18.1. A Fig. 10B mostra as curvas de ligação de anticorpos quiméricos 357B8F8 com sítios de PTM mutantes na linhagem de células CHO-CLDN18.2.

[0039] As Fig. 11A-Fig. 11C ilustram a ligação de variantes de anticorpos quiméricos exemplares na linhagem de células de câncer SNU620. Curvas de ligação de anticorpos quiméricos com sítios de PTM mutantes na linhagem de células de câncer gástrico SNU620 são da seguinte forma: Fig. 11A, 413H9F8; Fig. 11B, 264D1A7; e Fig. 11C, 357B8F8.

[0040] As Fig. 12A-Fig. 12D ilustram ligação competitiva de anticorpos quiméricos à linhagem de células CHO-CLDN18.2. A ligação de xi175D10 (Fig. 12A), 282A12F3 (T62A) (Fig. 12B), 413H9F8-VL-S32V (Fig. 12C) e 364D1A7-VL-S32V (Fig. 12D) em células CHO-CLDN18.2 foi monitorada após incubação com concentrações exemplares de xi175D10, 282A12F3(T62A), 413H9F8-VL-S32V, 364D1A7-VL-S32V ou hIgG1.

[0041] As Fig. 13A-Fig. 13E ilustram a atividade de ligação cruzada entre espécies em diferentes espécies de CLDN18.2 por anticorpos exemplares. Afinidades de ligação de hz282 (Fig. 13A), xi175D10 (Fig. 13B), 413H9F8-VL-S32V (Fig. 13C), 364D1A7-VL-S32V (Fig. 13D) e 357B8F8-VH-S61I-VL-S32I (Fig. 13E) foram determinadas em células CHO que expressam CLDN18.2 humana (quadrado fechado), de camundongo (círculo fechado) ou de *Cynomolgus* (triângulo fechado). hIgG1 foi definida como controle negativo.

[0042] As Fig. 14A-Fig. 14B ilustram a atividade de ADCC específica para CLDN18.2 induzida por anticorpos anti-CLDN18.2 e células FcR-TANK (CD16A-15V). As atividades de ADCC de variantes do anticorpo anti-CLDN18.2 foram determinadas em linhagens de células CHO-CLDN18.1 (Fig. 14A) e CHO-CLDN18.2 (Fig. 14B).

[0043] A Fig. 15 ilustra a atividade de ADCC de variantes de anticorpo quimérico na linhagem de células NCI-N87. A atividade de ADCC foi analisada na proporção de célula efetora (FcR-TANK (CD16A-15V)): célula-alvo de 2:1, e tempo de incubação de 16 horas. Dados de poços duplicados.

[0044] A Fig. 16 ilustra a atividade de ADCC de variantes de anticorpo quimérico na linhagem de células NUGC4-18.2. A atividade de ADCC foi analisada na proporção de célula efetora (PBMC): célula-alvo de 40:1, e tempo de incubação de 5 horas. Dados de um doador com poço duplicado.

[0045] A Fig. 17 ilustra a atividade de CDC de variantes de anticorpo quimérico na linhagem de células CHO-18.2.

[0046] As Fig. 18A-Fig. 18B ilustram a ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados a CHO-CLDN18.2. A Fig. 18A mostra as curvas de ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados em células CHO-CLDN18.2. A Fig. 18B mostra as curvas de ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados em células CHO-CLDN18.1.

[0047] As Fig. 19A-Fig. 19B ilustram a ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados às células de câncer gástrico SNU620. A Fig. 19A mostra as curvas de ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados hz282-1~hz282-10 em células de câncer gástrico SNU620. A Fig. 19B mostra as curvas de ligação de anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados

hz282-11~hz282-20 em células de câncer gástrico SNU620.

[0048] As Fig. 20A-Fig. 20D ilustram as afinidades de ligação de 413H9F8-VL-S32V humanizado (estratégia 1) às células CHO-CLDN18.2. As curvas de ligação total de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V estão ilustradas da seguinte forma: 413H9F8-cp1, 413H9F8-cp2 e 413H9F8-cp3 na Fig. 20A; 413H9F8-cp4, 413H9F8-cp5 e 413H9F8-cp 6 na Fig. 20B; 413H9F8-cp7, 413H9F8-cp8 e 413H9F8-cp9 na Fig. 20C; e 413H9F8-cp10, 413H9F8-cp811 e 413H9F8-cp12 na Fig. 20D. Os experimentos foram realizados em células CHO-CLDN18.2.

[0049] As Fig. 21A.-Fig. 21D ilustram as afinidades de ligação de 413H9F8-VL-S32V humanizado na estratégia 2 em células CHO-CLDN18.2. As curvas de ligação total de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V estão ilustradas da seguinte forma: 413H9F8-H1L1, 413H9F8-H2L1, 413H9F8-H3L1 e 413H9F8-H4L1 na Fig. 21A; 413H9F8-H1L2, 413H9F8-H2L2, 413H9F8-H3L2 e 413H9F8-H4L2 na Fig. 21B; 413H9F8-H1L3, 413H9F8-H2L3, 413H9F8-H3L3 e 413H9F8-H4L3 na Fig. 21C; 413H9F8-H1L4, 413H9F8-H2L4, 413H9F8-H3L4 e 413H9F8-H4L4 na Fig. 21D. Os experimentos foram realizados em células CHO-CLDN18.2.

[0050] As Fig. 22A-Fig. 22E ilustram as afinidades de ligação de 364D1A7-VL-S32V humanizado em células CHO-CLDN18.2. As curvas de ligação total de anticorpos 364D1A7-VL-S32V humanizados estão ilustradas da seguinte forma: 364D1A7-H1L1, 364D1A7-H2L1, 364D1A7-H3L1 e 364D1A7-H4L1 na Fig. 22A; 364D1A7-H1L2, 364D1A7-H2L2, 364D1A7-H3L2 e 364D1A7-H4L2 na Fig. 22B; 364D1A7-H1L3, 364D1A7-H2L3, 364D1A7-H3L3 e 364D1A7-H4L3 na Fig. 22C; 364D1A7-H1L4, 364D1A7-H2L4, 364D1A7-H3L4 e 364D1A7-H4L4 na Fig. 22D;

364D1A7-H1L5, 364D1A7-H2L5, 364D1A7-H3L5, e 364D1A7-H4L5 na Fig. 22E. Os experimentos foram realizados em células CHO-CLDN18.2.

[0051] As Fig. 23A-Fig. 23C ilustram as afinidades de ligação de anticorpos 413H9F8-VL-32V e 364D1A7-VL-S32V humanizados em células CHO-CLDN18.2. As Fig. 23A e Fig. 23B mostram curvas de ligação total de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V em células CHO-CLDN18.2. A Fig. 23C mostra a curva de ligação total de anticorpos 364D1A7-VL-S32V humanizados em células CHO-CLDN18.2.

[0052] As Fig. 24A-Fig. 24C ilustram a atividade de ADCC de variantes de anticorpo humanizado com células cR-TANK (CD16A-15V) contra a linhagem de células de câncer gástrico NCI-N87-CLDN18.2. Anticorpos humanizados de anticorpos 413H9F8 (Fig. 24A e Fig. 24B) e 364D1A7 (Fig. 24C) foram analisados quanto à sua capacidade para induzir ADCC com células FcR-TANK (CD16A-15V) contra células NCI-N87-CLDN18.2 em uma proporção de célula efetora: célula-alvo de 8:1. Células mistas foram cultivadas por 4 horas.

[0053] As Fig. 25A-Fig. 25C ilustram atividade de ADCC de variantes de anticorpo humanizado com PBMCs humanas contra a linhagem de células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2. Anticorpos humanizados de anticorpos 413H9F8 (Fig. 25A e Fig. 25B) e 364D1A7 (Fig. 25C) foram analisados quanto às suas habilidades para induzir ADCC com PBMCs humanas contra células NUGC4-CLDN18.2 em uma proporção de célula efetora: célula-alvo de 40:1. As células foram cultivadas por 5 horas. Os dados são de um doador com poços duplicados.

[0054] As Fig. 26A-Fig. 26B ilustram as atividades de CDC de variantes de anticorpo humanizado em linhagem de células

CHO-18.2. As atividades de CDC de anticorpos 413H9F8-VL-S32V (Fig. 26A) e 364D1A7-VL-S32V (Fig. 26B) humanizados foram determinadas com soro humano contra célula CHO-CLDN18.2.

[0055] A Fig. 27 ilustra uma estrutura de design exemplar para Mab-mc-vc-PAB-MMAE usada no estudo.

[0056] As Fig. 28A-Fig. 28B ilustram ADCs CLDN18.2-específicas que inibem a viabilidade de células HEK293-CLDN18.2. A viabilidade de células HEK293-CLDN18.2 (Fig. 28A) e HEK293 (Fig. 28B) foi determinada após tratamento com ADCs xi175D10-vcMMAE (DAR = 4,02), 282A12F3(T62A)-vcMMAE (DAR = 3,94) e hIgG1-vcMMAE (DAR = 3,91) e anticorpos *naked* xi175D10 282A12F3(T62A) e hIgG1 por 5 dias. A viabilidade foi determinada na linhagem de células HEK293 que expressam CLDN18.2.

[0057] As Fig. 29A.-Fig. 29B ilustram ADCs CLDN18.2-específicas que inibem a viabilidade de células NCI-N87-CLDN18.2 e NUGC4-CLDN18.2. A viabilidade de células NCI-N87-CLDN18.2 (Fig. 29A) e NUGC4-CLDN18.2 (Fig. 29B) foi determinada após tratamento com ADCs xi175D10-vcMMAE (DAR = 4,02), 282A12F3 (T62A)-vcMMAE (DAR = 3,94) e hIgG1-vcMMAE (DAR = 3,91) por 5 dias.

[0058] As Fig. 30A-Fig. 30B ilustram que ADCs CLDN18.2-específicas inibiram a viabilidade de células PANC-1-CLDN18.2. A Fig. 30A mostra a eficácia da ADCC de 282A12F3 (T62A) em células PANC-1-CLDN18.2. A Fig. 30B mostra a viabilidade de células PANC-1-CLDN18.2 após tratadas com ADCs CLDN18.2-específicas, xi175D10-vcMMAE (DAR = 4,02), 282A12F3 (T62A)-vcMMAE (DAR = 3,94) e hIgG1-vcMMAE (DAR = 3,91) por 5 dias.

[0059] A Fig. 31 ilustra a atividade de ADCC de variantes

de 413H9F8-cp2 com células FcR-TANK (CD16A-15V) contra a linhagem de células CHO-CLDN18.2.

[0060] A Fig. 32 ilustra as atividades de ADCC de variantes de 413H9F8-cp2 e 413H9F8-H2L2 com PBMCs humanas contra a linhagem de células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2.

[0061] A Fig. 33A-33B ilustram internalização de anticorpos anti-CLDN18.2 por células NUGC4-CLDN18.2 (Fig. 33A) e células NCI-N87-CLDN18.2 (Fig. 33B).

[0062] A Fig. 34 ilustra as eficácias de anticorpos anti-CLDN18.2 no modelo de xenoenxerto derivado de paciente com câncer gástrico humano GA0006 (PDX) em camundongos *nude*.

[0063] As Fig. 35A-35E ilustram a eficácia de anticorpos anti-CLDN18.2 em modelos de xenoenxerto em camundongo de câncer pancreático em camundongos Nu/Nu.

[0064] A Fig. 36 ilustra as eficácias combinatórias de anticorpos anti-CLDN18.2 e quimioterapia no modelo de xenoenxerto derivado de paciente com câncer gástrico humano GA0006 (PDX).

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA REVELAÇÃO**

[0065] Claudinas (CLDNs) são proteínas centrais da junção de oclusão que regulam a função e polaridade da barreira da célula epitelial criando, dessa forma, um limite entre os domínios da membrana plasmática apical e basolateral. Até hoje, 27 membros da família CLDN foram descritos com diferentes padrões de expressão órgão-específicos. Foi demonstrado que os níveis de expressão de claudinas estão frequentemente anormais em neoplasias humanas. Um dos membros da família CLDN, CLDN-18 isoforma 2 (CLDN18.2), é um antígeno seletivo da linhagem gástrica, e sua expressão em

tecidos normais está confinada às células epiteliais diferenciadas da mucosa gástrica.

[0066] A proteína CLDN18.2 está altamente conservada no camundongo, rato, coelho, cão, macaco e humano e compreende quatro domínios transmembrana e dois domínios extracelulares. Cerca de 8 dos 51 resíduos de aminoácidos dentro do primeiro domínio extracelular diferem da isoforma 1 de CLDN-18 específica do tecido pulmonar (CLDN18.1), e podem servir como um epitopo para ligação de anticorpo monoclonal.

[0067] Sob um cenário de câncer, CLDN18.2 demonstrou que está envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral. Na verdade, CLDN18.2 demonstrou ser exibida na superfície de células de câncer gástrico humano e suas metástases (Sahin, e cols., "Claudin-18 Splice Variant 2 is a Pan-Cancer Target Suitable for Therapeutic Antibody Development", *Clin. Cancer Res.* 2008; **14**: 7.624-34) e sua ativação ectópica foi observada no câncer pancreático (Woll, e cols., "Claudin 18.2 is a Target for IMAB362 Antibody in Pancreatic Neoplasms", *Int. J. Cancer* 2014; **134**: 731-739; e Tanaka, e cols., "Claudin-18 is an Early-Stage Marker of Pancreatic Carcinogenesis", *J. Histochem. Cytochem.* 2011; **59**: 942-952). A ativação aberrante de CLDN18.2 também foi observada nos cânceres do ducto biliar, esofágicos, ovarianos e de pulmão, e foi associada com sobrevida global pobre e metástase de linfonodos (Shinozaki, e cols., "Claudin-18 in Biliary Neoplasms. Its Significance in the Classification of Intrahepatic Cholangiocarcinoma", *Virchows Arch.* 2011; **459**: 73-80; e Micke, e cols., "Aberrantly Activated Claudin 6 and 18.2 as Potential Therapy Targets in Non-Small-Cell Lung

Cancer", *Int. J. CNCER* 2014; **135**: 2.206-2.214).

[0068] São revelados nesse relatório descritivo, em certas modalidades, anticorpos anti-CLDN18.2 e usos destes. Em alguns casos, os anticorpos anti-CLDN18.2 são anticorpos quiméricos. Em outros casos, os anticorpos anti-CLDN18.2 são anticorpos humanizados. Em casos adicionais, são revelados nesse relatório descritivo métodos de tratamento e métodos de indução de efeito de morte celular que utilizam um anticorpo anti-CLDN18.2.

#### **Anticorpos anti-Claudina 18.2**

[0069] São revelados nesse relatório descritivo, em certas modalidades, anticorpos anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2). Em alguns casos, um anticorpo anti-CLDN18.2 se liga a um domínio extracelular de CLDN18.2. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 se liga ao primeiro domínio extracelular de CLDN18.2. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 se liga a uma região do resíduo oito dentro do primeiro domínio extracelular de CLDN18.2, por exemplo, resíduos 32-41 de CLDN18.2 humana (Identificador UniProtKB P56856-2). Em algumas modalidades, também são descritos nesse relatório descritivo anticorpos anti-CLDN18.2 que compreendem uma ou mais mutações em sítios de modificação pós-tradução, com propriedades funcionais diferentes em relação a um anticorpo anti-CLDN18.2 de referência, e/ou com seletividade para uma isoforma de CLDN18.2.

[0070] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma metade da concentração efetiva máxima ( $EC_{50}$ ) que é menor do que uma  $EC_{50}$  de um anticorpo anti-CLDN18.2 de referência. Em alguns casos, o anticorpo de referência é 175D10, que

compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e ID. DE SEQ. N°: 99, respectivamente. Em alguns casos, a EC<sub>50</sub> do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 5 nM ou menor. Em alguns casos, a EC<sub>50</sub> do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 4 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1 nM, cerca de 0,5 nM, ou menor.

[0071] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma afinidade de ligação maior para CLDN18.2 em relação a uma afinidade de ligação de um anticorpo anti-CLDN18.2 de referência. Em alguns casos, o anticorpo de referência é 175D10, que compreende uma sequência da cadeia pesada e uma sequência da cadeia leve apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e ID. DE SEQ. N°: 99, respectivamente.

[0072] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo possui uma citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC) aumentada, comparado com um anticorpo anti-CLDN18.2 de referência. Em alguns casos, o anticorpo de referência é 175D10, que compreende uma sequência da cadeia pesada e uma sequência da cadeia leve apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e ID. DE SEQ. N°: 99, respectivamente. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 ainda compreende uma mutação em uma região Fc que confere ADCC aumentada.

[0073] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende pelo menos uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução.

[0074] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo especificamente

se liga a uma isoforma de CLDN18.2. Em alguns casos, a isoforma de CLDN18.2 é uma isoforma expressa na linhagem de células SNU620.

[0075] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL), em que a região VH compreende sequência CDR1 GFSLTSYX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>; sequência CDR2 VIWX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S; e sequência CDR3 DX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>; em que X<sub>1</sub> é selecionado de N ou G; X<sub>2</sub> é selecionado de Y ou H; X<sub>3</sub> é selecionado de N ou P; X<sub>4</sub> é selecionado de T ou G; X<sub>5</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>6</sub> é selecionado de R ou N; X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I; X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A; X<sub>10</sub> é selecionado de K ou M; X<sub>11</sub> é selecionado de S ou R; X<sub>12</sub> é selecionado de A ou R; X<sub>13</sub> é selecionado de M ou L; X<sub>14</sub> é selecionado de P ou A; X<sub>15</sub> é selecionado de A ou M; X<sub>16</sub> é selecionado de I ou D; X<sub>17</sub> é selecionado de P ou Y; X<sub>18</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>19</sub> está presente ou ausente e, se presente, é A; e X<sub>20</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y.

[0076] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SFGMH; sequência CDR2 YISSGSX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>IYYX<sub>28</sub>DX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KG; e sequência CDR3 AX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>; em que X<sub>21</sub> está presente ou ausente e, se presente, é G; X<sub>22</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>23</sub> está presente ou ausente e, se presente, é T; X<sub>24</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>25</sub> está presente ou ausente e, se presente, é S; X<sub>26</sub> é selecionado de S ou G; X<sub>27</sub> é selecionado de P ou S; X<sub>28</sub> é selecionado de V ou A; X<sub>29</sub> é selecionado de K ou T; e X<sub>30</sub> é

selecionado de L ou V; X<sub>31</sub> é selecionado de G ou T; X<sub>32</sub> é selecionado de Y ou S; X<sub>33</sub> é selecionado de A ou Y; X<sub>34</sub> é selecionado de V ou Y; X<sub>35</sub> é selecionado de R ou Y; X<sub>36</sub> é selecionado de N ou G; X<sub>37</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>38</sub> é selecionado de L ou A; X<sub>39</sub> é selecionado de D ou L; X<sub>40</sub> é selecionado de Y ou E; e X<sub>41</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y.

[0077] Em algumas modalidades, a região VH compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas da Tabela 1.

<b>VH</b>	<b>CDR1</b>	<b>ID. DE SEQ. Nº :</b>	<b>CDR2</b>	<b>ID. DE SEQ. Nº :</b>	<b>CDR3</b>	<b>ID. DE SEQ. Nº :</b>
282A12F3-VH (Parental)	GFSLTSYNVY	1	VIWNTGATRYNSTLKS	2	DSAMPAIPFAY	3
282A12F3-VH- N60Q	GFSLTSYNVY	1	VIWNTGATRYQSTLKS	4	DSAMPAIPFAY	3
282A12F3-VH- N60E	GFSLTSYNVY	1	VIWNTGATRYESTLKS	5	DSAMPAIPFAY	3
282A12F3-VH- NSA (T62A)	GFSLTSYNVY	1	VIWNTGATRYNSALKS	6	DSAMPAIPFAY	3
413H9F8-VH (Parental)	GFTFSSF <del>GMH</del>	7	YISSGSSPIYYVDK <del>LK</del> G	8	AGYAVRNALDY	9
364D1A7-VH (Parental)	SFGMH	10	YISSGSGSIYYADTVK G	11	ATSYYYGNALEY	12
357B8F8-VH (Parental)	GFSLTSYGVH	13	VIWPGGNTNYNSALMS	14	DRRLAMDY	15
357B8F8-VH- N60E	GFSLTSYGVH	13	VIWPGGNTNYESALMS	16	DRRLAMDY	15

357B8F8-VH- S61I	GFSLTSYGVH	13	VIWPGGNTNYNIALMS	17	DRRLAMDY	15
---------------------	------------	----	------------------	----	----------	----

[0078] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1, sequência CDR2 VIWNTGATRYX<sub>7</sub>SX<sub>9</sub>LKS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; e X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A.

[0079] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13, sequência CDR2 VIWPGGNTNYX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>ALMS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N ou E; e X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I.

[0080] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 1, 7, 10 ou 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 3, 9, 12 ou 15.

[0081] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5 ou 6; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3.

[0082] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15.

[0083] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 7, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 8, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 9.

[0084] Em alguns casos, a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 10, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 11, e sequência CDR3 que consiste

no ID. DE SEQ. N°: 12.

[0085] Em algumas modalidades, a região VL compreende sequências CDR1, CDR2 e CDR3 selecionadas da Tabela 2.

<b>VL</b>	<b>CDR1</b>	<b>ID. DE SEQ. N°:</b>	<b>CDR2</b>	<b>ID. DE SEQ. N°:</b>	<b>CDR3</b>	<b>ID. DE SEQ. N°:</b>
<b>282A12-VL</b>	KSSQSLFGSVRQKNYLA	18	LASTRES	19	QQYYDIPWT	20
413H9F8-VL (Parental)	KSSQSLLNSGNQKNYLA	21	GASTRES	22	QNDLFYPLT	23
413H9F8-VL-N31D	KSSQSLLDSGNQKNYLA	24	GASTRES	22	QNDLFYPLT	23
413H9F8-VL-N31E	KSSQSLLESGNQKNYLA	25	GASTRES	22	QNDLFYPLT	23
413H9F8-VL-S32L	KSSQSLLNLGNQKNYLA	26	GASTRES	22	QNDLFYPLT	23
413H9F8-VL-S32V	KSSQSLLNVGNQKNYLA	27	GASTRES	22	QNDLFYPLT	23
364D1A7-VL (Parental)	KSSQSLFNNSGNQKNYLT	28	WASTRKS	29	QNVYSYPLT	30
364D1A7-VL-N31D	KSSQSLFDNSGNQKNYLT	31	WASTRKS	29	QNVYSYPLT	30
364D1A7-VL-N31E	KSSQSLFESGNQKNYLT	32	WASTRKS	29	QNVYSYPLT	30
364D1A7-VL-S32L	KSSQSLFNLGNQKNYLT	33	WASTRKS	29	QNVYSYPLT	30
364D1A7-VL-S32V	KSSQSLFNVGNQKNYLT	34	WASTRKS	29	QNVYSYPLT	30
357B8F8-VL (Parental)	KSSQSLLNSGNQKNYLT	35	WASTRES	36	QNDYSYPFT	37
357B8F8-VL-N31E	KSSQSLLNSGNQKNYLT	38	WASTRES	36	QNDYSYPFT	37
357B8F8-VL-S32I	KSSQSLLNIGNQKNYLT	39	WASTRES	36	QNDYSYPFT	37

[0086] Em alguns casos, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 18, 21, 24-28, 31-35, 38 ou 39; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 19, 22, 29 ou 36; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 20, 23, 30 ou 37.

[0087] Em alguns casos, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 21 ou 24-27; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 22; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 23.

[0088] Em alguns casos, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 28 ou 31-34; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 29; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 30.

[0089] Em alguns casos, a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 35, 38 ou 39; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 36; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 37.

[0090] Em alguns casos, a região VL compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 18, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 19, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 20.

[0091] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 GFSLTSYX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>; sequência CDR2 VIWX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S; e sequência CDR3 DX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>; em que X<sub>1</sub> é selecionado de N ou G; X<sub>2</sub> é selecionado de Y ou H; X<sub>3</sub> é selecionado de N ou P; X<sub>4</sub> é selecionado de T ou G; X<sub>5</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>6</sub> é selecionado de R ou N; X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I; X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A; X<sub>10</sub> é selecionado de K ou M; X<sub>11</sub> é

selecionado de S ou R; X<sub>12</sub> é selecionado de A ou R; X<sub>13</sub> é selecionado de M ou L; X<sub>14</sub> é selecionado de P ou A; X<sub>15</sub> é selecionado de A ou M; X<sub>16</sub> é selecionado de I ou D; X<sub>17</sub> é selecionado de P ou Y; X<sub>18</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>19</sub> está presente ou ausente e, se presente, é A; e X<sub>20</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 18, 35, 38 ou 39; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 19 ou 36; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 20 ou 37.

[0092] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SFGMH; sequência CDR2 YISSGSX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>IYYX<sub>28</sub>DX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KG; e sequência CDR3 AX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>; em que X<sub>21</sub> está presente ou ausente e, se presente, é G; X<sub>22</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>23</sub> está presente ou ausente e, se presente, é T; X<sub>24</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>25</sub> está presente ou ausente e, se presente, é S; X<sub>26</sub> é selecionado de S ou G; X<sub>27</sub> é selecionado de P ou S; X<sub>28</sub> é selecionado de V ou A; X<sub>29</sub> é selecionado de K ou T; e X<sub>30</sub> é selecionado de L ou V; X<sub>31</sub> é selecionado de G ou T; X<sub>32</sub> é selecionado de Y ou S; X<sub>33</sub> é selecionado de A ou Y; X<sub>34</sub> é selecionado de V ou Y; X<sub>35</sub> é selecionado de R ou Y; X<sub>36</sub> é selecionado de N ou G; X<sub>37</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>38</sub> é selecionado de L ou A; X<sub>39</sub> é selecionado de D ou L; X<sub>40</sub> é selecionado de Y ou E; e X<sub>41</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 21, 24-28, ou 31-34; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 22 ou 29; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 23 ou 30.

[0093] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1, sequência CDR2 VIWNTGATRYX<sub>7</sub>SX<sub>9</sub>LKS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; e X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A; e uma região VL que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 18, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 19, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 20.

[0094] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13, sequência CDR2 VIWPGGNTNYX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>ALMS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15, em que X<sub>7</sub> é selecionado de N ou E; e X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 35, 38 ou 39; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 36; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 37.

[0095] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 1, 7, 10 ou 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 3, 9, 12 ou 15; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 18, 21, 24-28, 31-35, 38 ou 39; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 19, 22, 29 ou 36; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 20, 23, 30 ou 37.

[0096] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que

consiste no ID. DE SEQ. N°: 1; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 2, 4, 5 ou 6; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3; e uma região VL que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 18, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 19, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 20.

[0097] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 35, 38 ou 39; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 36; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 37.

[0098] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 7, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 8, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 9; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 21 ou 24-27; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 22; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 23.

[0099] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região VH que compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 10, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 11, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 12; e uma região VL que compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N°s: 28 ou 31-34; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 29; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 30.

[00100] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo é um anticorpo de comprimento total ou um fragmento de ligação deste. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste. Em outros casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo humanizado ou um fragmento de ligação deste. Em casos adicionais, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação deste.

[00101] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um Fab' monovalente, um Fab2 divalente, um fragmento variável de cadeia única (scFv), um *diabody*, um *minibody*, um *nanobody*, um anticorpo de domínio único (sdAb), ou um anticorpo de camelídeo ou fragmento de ligação deste.

[00102] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo biespecífico ou fragmento de ligação deste. Formatos exemplares de anticorpo biespecífico incluem, sem limitação, "Knobs-into-Holes" (KiH), Tecnologia de Reengenharia Assimétrica-Imunoglobulina (ART-Ig), quadroma Triomab, anticorpo monoclonal biespecífico (BiMAb, BsmAb, BsAb, bsMab, BS-Mab ou Bi-MAb), "Azymeric", Engajamento Biespecífico por Anticorpos com base no receptor de célula T (BEAT), Engajador Biespecífico de Célula T (BiTE), "Biclonics", Fab-scFv-Fc, Fab Dois-em-Um/Ação Dupla (DAF), FinomAb, fusão scFv-Fc-(Fab), "Dock-aNd-Lock" (DNL), Adaptir (previamente SCORPION), Tandem diAbody (TandAb), "Dual-Affinity-ReTargeting" (DART), *nanobody*, *triplebody*, scFv tandens (taFv), "Triple Heads", dAb/VHH em tandem, dAb/VHH triplo ou dAb/VHH tetravalente. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo biespecífico ou fragmento de

ligação deste que compreende um formato de anticorpo biespecífico ilustrado na FIG. 2 de Brinkmann e Kontermann, "The Making os Bispecific Antibodies", *MABS* **9** (2): 182-212 (2017).

[00103] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução. Em alguns casos, a mutação está dentro da região VH. Em outros casos, a mutação está dentro da região VL. Em casos adicionais, duas ou mais mutações estão dentro da região VH, da região VL, ou uma combinação destas.

[00104] Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60, 61 ou 62 da região VH do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual a posição de aminoácido corresponde à posição 60, 61 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 61, que corresponde à posição 60 ou 61 do ID. DE SEQ. N°: 40. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 62, que corresponde à posição 60 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 61 (S61) do ID. DE SEQ. N°: 40. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 62 (T62) do ID. DE SEQ. N°: 40. Em alguns casos, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de referência 175D10.

[00105] Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60, 61 ou 62 da região VH do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual a posição de aminoácido corresponde à posição 60, 61 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 61, que

corresponde à posição 60 ou 61 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 62, que corresponde à posição 60 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 61 (S61) do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 62 (T62) do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de referência 175D10.

[00106] Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N60 é mutado para um aminoácido polar ou um aminoácido ácido. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N60 é mutado para um aminoácido polar selecionado de serina, treonina, asparagina ou glutamina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N60 é mutado para um aminoácido ácido selecionado de ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N60 é mutado para glutamina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N60 é mutado para ácido glutâmico.

[00107] Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S61 é mutado para um resíduo não polar, opcionalmente selecionado de alanina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S61 é mutado para isoleucina.

[00108] Em alguns casos, o resíduo de aminoácido T62 é mutado para um resíduo não polar, opcionalmente selecionado de alanina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido T62 é mutado para alanina.

[00109] Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 31 ou 32 da região VL do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 46. Em alguns casos, a mutação está na posição de aminoácido 31 (N31) ou 32 (S32) do ID. DE SEQ. N°: 46. Em alguns casos, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de referência 175D10.

[00110] Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 31 ou 32 da região VL do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 52. Em alguns casos, a mutação está na posição de aminoácido 31 (N31) ou 32 (S32) do ID. DE SEQ. N°: 52. Em alguns casos, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de referência 175D10.

[00111] Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 31 ou 32 da região VL do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 60. Em alguns casos, a mutação está na posição de aminoácido 31 (N31) ou 32 (S32) do ID. DE SEQ. N°: 60. Em alguns casos, a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de referência 175D10.

[00112] Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N31 é mutado para um aminoácido ácido. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N31 é mutado para ácido aspártico ou ácido glutâmico. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N31 é mutado para ácido aspártico. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido N31 é mutado para ácido glutâmico.

[00113] Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S32 é mutado para um resíduo não polar, opcionalmente selecionado de alanina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S32 é mutado para leucina, valina ou isoleucina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S32 é mutado para leucina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S32 é mutado para valina. Em alguns casos, o resíduo de aminoácido S32 é mutado para isoleucina.

[00114] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma mutação em uma posição de aminoácido 60, 61 ou 62 da região VH do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual a posição de aminoácido corresponde à posição 60, 61 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 57; e uma mutação em uma posição de aminoácido 31 ou 32 da região VL do anticorpo anti-CLDN18.2, no qual as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. N°: 60. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 61, que corresponde à posição 60 ou 61 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 62, que corresponde à posição 60 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 61 (S61) do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está em uma posição de aminoácido 60 (N60) ou 62 (T62) do ID. DE SEQ. N°: 57. Em alguns casos, a mutação está na posição de aminoácido 31 (N31) ou 32 (S32) do ID. DE SEQ. N°: 60. Em alguns casos, as mutações aumentam a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 em relação ao anticorpo de

referência 175D10.

[00115] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo é um anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste. Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 40-43 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 44. Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 45 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 46-50. Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 51 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 52-56. Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 57-59 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 60-62.

[00116] Em algumas modalidades, a região VH e a região VL de um anticorpo quimérico anti-CLDN18.2 estão ilustradas na Tabela 3. As regiões sublinhadas representam as

respectivas sequências CDR1, CDR2 ou CDR3.

NOME	SEQUÊNCIA	ID. DE SEQ. N° :
282A12F3-VH (Parental)	<u>QVQLKESGPVLVQPSQTL</u> <u>SLTCTVAGFSLTSYNVY</u> WVRQPPGKGLEWMGVIWNTGATRYNSTLKSRLSIS KDTSKSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARD <u>SAMPAIP</u> <u>FAYWGQGLTVTVSS</u>	40
282A12F3-VH-N60Q	<u>QVQLKESGPVLVQPSQTL</u> <u>SLTCTVAGFSLTSYNVY</u> WVRQPPGKGLEWMGVIWNTGATRYQSTLKSRLSIS KDTSKSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARD <u>SAMPAIP</u> <u>FAYWGQGLTVTVSS</u>	41
282A12F3-VH-N60E	<u>QVQLKESGPVLVQPSQTL</u> <u>SLTCTVAGFSLTSYNVY</u> WVRQPPGKGLEWMGVIWNTGATRYESTLKSRLSIS KDTSKSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARD <u>SAMPAIP</u> <u>FAYWGQGLTVTVSS</u>	42
282A12F3-VH-NSA (T62A)	<u>QVQLKESGPVLVQPSQTL</u> <u>SLTCTVAGFSLTSYNVY</u> WVRQPPGKGLEWMGVIWNTGATRYNSALKSRLSIS KDTSKSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARD <u>SAMPAIP</u> <u>FAYWGQGLTVTVSS</u>	43
282A12-VL	DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSSQSLFGSVRQ <u>KNYLAWYQQKPGQSPKLLIYL</u> <u>ASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAKYYC <u>QQYYDIPWTFG</u> GGTKLELK	44
413H9F8-VH (Parental)	DVQLVESGGGSVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMH WVRQAPEKGLEWVAYI <u>SSGSSPIYYVDKLG</u> RFTV SRDNPKNLTLFLQMTSLRSED <u>TAMYYCARAGYAVRN</u> <u>ALDYWGQGTSITVSS</u>	45
413H9F8-VL (Parental)	DIVMTQSPSSLVSVGKVTLSCKSSQSLNLSGNQ <u>KNYLAWYQQKTGQPPKLLIY</u> <u>GASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFC <u>QNDLFYPLTFG</u>	46

	AGTKLELK	
413H9F8-VL- N31D	<u>DIVMTQSPSSLSVSVGEKVTLSCKSSQSLLDSGNQ</u> <u>KNYLAWYQQKTGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFC <u>QNDLFYPLTFG</u> AGTKLELK	47
413H9F8-VL- N31E	<u>DIVMTQSPSSLSVSVGEKVTLSCKSSQSLLESGNQ</u> <u>KNYLAWYQQKTGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFC <u>QNDLFYPLTFG</u> AGTKLELK	48
413H9F8-VL- S32L	<u>DIVMTQSPSSLSVSVGEKVTLSCKSSQSLLNLGNQ</u> <u>KNYLAWYQQKTGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFC <u>QNDLFYPLTFG</u> AGTKLELK	49
413H9F8-VL- S32V	<u>DIVMTQSPSSLSVSVGEKVTLSCKSSQSLLNVGNQ</u> <u>KNYLAWYQQKTGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFIG</u> SGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYFC <u>QNDLFYPLTFG</u> AGTKLELK	50
364D1A7-VH (Parental)	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMH WVRQAPEKGLEWVAYISSGSGSIYYADTVKGRFTL SRDNPKNLTLFLQMTSLRSEDTAIYYCATSYYYGNA <u>LEYWGQGTSVTVSS</u>	51
364D1A7-VL (Parental)	DVVLTVQSPSSLTVTEGEKVSMSCKSSQSFLNSGNQ <u>KNYLWYQQKPGQTPTLIIYWASTRKS</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTINTVQAEDLAVYYC <u>QNVYSYPLTFG</u> AGTKLDLK	52
364D1A7-VL- N31D	DVVLTVQSPSSLTVTEGEKVSMSCKSSQSFLDSGNQ <u>KNYLWYQQKPGQTPTLIIYWASTRKS</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTINTVQAEDLAVYYC <u>QNVYSYPLTFG</u> AGTKLDLK	53
364D1A7-VL-	DVVLTVQSPSSLTVTEGEKVSMSCKSSQSFLFESGNQ	54

N31E	<u>KNYLTWYQQKPGQTP</u> LLIY <u>WASTRKS</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTINTVQAEDLAVYYC <u>QNVYSYPLTFG</u> AGTKLDLK	
364D1A7-VL- S32L	DVVL <u>TQSPSS</u> LTVTEGEKVSMSCKSSQSLFN <u>LGNO</u> <u>KNYLTWYQQKPGQTP</u> LLIY <u>WASTRKS</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTINTVQAEDLAVYYC <u>QNVYSYPLTFG</u> AGTKLDLK	55
364D1A7-VL- S32V	DVVL <u>TQSPSS</u> LTVTEGEKVSMSCKSSQSLFN <u>VGNQ</u> <u>KNYLTWYQQKPGQTP</u> LLIY <u>WASTRKS</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTINTVQAEDLAVYYC <u>QNVYSYPLTFG</u> AGTKLDLK	56
357B8F8-VH (Parental)	<u>QVQLKESG</u> PGLVAPSQSL <u>SITCTVSGFSLTSYGVH</u> WVRQPPGKGLEWL <u>GVIWPGGNTN</u> YNSALMSRLSIS KDNSKSQVFLKMNSLQTD <u>D</u> TAMYYCARD <u>RRLAMDY</u> WGQGSVTVSS	57
357B8F8-VH- N60E	<u>QVQLKESG</u> PGLVAPSQSL <u>SITCTVSGFSLTSYGVH</u> WVRQPPGKGLEWL <u>GVIWPGGNTN</u> YESALMSRLSIS KDNSKSQVFLKMNSLQTD <u>D</u> TAMYYCARD <u>RRLAMDY</u> WGQGSVTVSS	58
357B8F8-VH- S61I	<u>QVQLKESG</u> PGLVAPSQSL <u>SITCTVSGFSLTSYGVH</u> WVRQPPGKGLEWL <u>GVIWPGGNTN</u> YNIALMSRLSIS KDNSKSQVFLKMNSLQTD <u>D</u> TAMYYCARD <u>RRLAMDY</u> WGQGSVTVSS	59
357B8F8-VL (Parental)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCKSSQSL <u>LN</u> SGNQ <u>KNYLTWYQQKPGQPP</u> KLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTISILQAEDLAVYYCQNDYSY <u>PFTFG</u> SGTKLEIK	60
357B8F8-VL- N31E	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCKSSQSL <u>LES</u> GNQ <u>KNYLTWYQQKPGQPP</u> KLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFTG SGSGTDFTLTISILQAEDLAVYYCQNDYSY <u>PFTFG</u>	61

	SGTKLEIK	
357B8F8-VL-S32I	<u>DIVMTQSPSSLT</u> VTAGEKVTMTCKSSQSLLNIGNQ <u>KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES</u> GVDPDRFTG SGSGTDFTLTISILQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFG	62
	SGTKLEIK	

[00117] Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste ainda compreende uma região CH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 63 e uma região CL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 64. Em alguns casos, o anticorpo quimérico ou um fragmento de ligação deste compreende uma região CH e uma região CL como apresentadas na Tabela 4.

	SEQUÊNCIA	ID. DE SEQ. N°:
<b>Sequência de aminoácidos CH de IgG1 humana</b>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	63
<b>Sequência de aminoácidos CL de IgG1 humana</b>	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG	64

	LSSPVTKSFNRGEC	
--	----------------	--

[00118] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo é um anticorpo humanizado ou um fragmento de ligação deste. Em alguns casos, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 65-68 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 69-73. Em alguns casos, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 74-76 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 77-80. Em alguns casos, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 81-84 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 85-88. Em alguns casos, o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 89-92 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 93-97.

[00119] Em algumas modalidades, a região VH e a região VL de um anticorpo humanizado anti-CLDN18.2 são ilustradas na Tabela 5. As regiões sublinhadas representam as

respectivas sequências CDR1, CDR2 ou CDR3.

NOME	SEQUÊNCIA	ID. DE SEQ. N° :
282A12_VH g0	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSY</u> <u>NVYWIRQPPGKGLEWIGVIWNTGATRYNSALK</u> <u>SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA</u> RDSAMPAIPFAYWGQGLTVTVSS	65
282A12_VH g1	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSY</u> <u>NVYWIRQPPGKGLEWIGVIWNTGATRYNSALK</u> <u>SRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA</u> RDSAMPAIPFAYWGQGLTVTVSS	66
282A12_VH g2	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSY</u> <u>NVYWIRQPPGKGLEWIGVIWNTGATRYNSALK</u> <u>SRVTISKDTSKQVSLKLSSVTAADTAVYYCA</u> RDSAMPAIPFAYWGQGLTVTVSS	67
282A12_VH g3	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVAGFSLTSY</u> <u>NVYWIRQPPGKGLEWIGVIWNTGATRYNSALK</u> <u>SRVTISKDTSKQVSLKLSSVTAADTAVYYCA</u> RDSAMPAIPFAYWGQGLTVTVSS	68
282A12_VL g0	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFGS <u>VRQKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYLASTRESGV</u> <u>PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYCQQ</u> <u>YYDIPWTFGGGTKVEIK</u>	69
282A12_VL g1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFGS <u>VRQKNYLAWYQOKPGQSPKLLIYLASTRESGV</u> <u>PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAKYYCQQ</u> <u>YYDIPWTFGGGTKVEIK</u>	70
282A12_VL g2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLFGS <u>VRQKNYLAWYQOKPGKAPKLLIYLASTRESGV</u> <u>PSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQ</u>	71

	<u>YYDIPWTFGGGKVEIK</u>	
282A12_VL g3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLFGS <u>VRQKNYLAWYQQKPGKSPKLLIYLASTRESGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAKYC <u>QQ</u> <u>YYDIPWTFGGGKVEIK</u>	72
282A12_VL g4	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTINCKSSQSLFGS <u>VRQKNYLAWYQQKPGKSPKLLIYLASTRESGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAKYC <u>QQ</u> <u>YYDIPWTFGGGKVEIK</u>	73
413H9F8_VHg0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF <u>GMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> ARAGYAVRNALDYWGQGTLLVTVSS	74
413H9F8_VHg1	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> ARAGYAVRNALDYWGQGTLLVTVSS	75
413H9F8_VHg2	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> ARAGYAVRNALDYWGQGTLLVTVSS	76
413H9F8_VLg0	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCKSSQSLLN <u>GNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGI</u> PARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC <u>QN</u> <u>DLFYPLTFGGGKVEIK</u>	77
413H9F8_VLg1	DIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCKSSQSLLN <u>GNQKNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRESGI</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC <u>QN</u> <u>DLFYPLTFGGGKVEIK</u>	78
413H9F8_VLg2	DIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCKSSQSLLN	79

	<u>GNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTRESGI</u> PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFAVYYC <u>Q</u> <u>N</u> <u>DLFYPLTFGGGTKVEIK</u>	
413H9F8_VLg3	DIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSC <u>KSSQ</u> SLLN <u>V</u> <u>GNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYGASTRESGI</u> PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFAVYFC <u>Q</u> <u>N</u> <u>DLFYPLTFGGGTKVEIK</u>	80
413H9F8_HC-V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFS</u> <u>SF</u> <u>GMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYC <u>ARAGYAVRNALDYWGQGT</u> LVTVSS	81
413H9F8_HC-V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFS</u> <u>SF</u> <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTISRDNAKNSLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYC <u>ARAGYAVRNALDYWGQGT</u> LVTVSS	82
413H9F8_HC-V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFS</u> <u>SF</u> <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTVSRDNAKNSLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYC <u>ARAGYAVRNALDYWGQGT</u> LVTVSS	83
413H9F8_HC-V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFS</u> <u>SF</u> <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSPIYYVDKL</u> <u>KGRFTVSRDNAKNSLYLQMT</u> SLRAEDTAVYYC <u>ARAGYAVRNALDYWGQGT</u> LVTVSS	84
413H9F8_LC-V1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>C</u> <u>KSSQ</u> SLLN <u>V</u> <u>GNQKNYLAWYQQKPGQP</u> PKLLIYGASTRES <u>G</u> <u>V</u> PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYYC <u>Q</u> <u>N</u> <u>DLFYPLTFGGGTKVEIK</u>	85
413H9F8_LC-V2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>C</u> <u>KSSQ</u> SLLN <u>V</u> <u>GNQKNYLAWYQQKPGQP</u> PKLLIYGASTRES <u>G</u> <u>V</u> PDRFSGSGSGTDFTLTITSSLQAEDVAVYFC <u>Q</u> <u>N</u>	86

	<u>DLFYPLTFGGGKVEIK</u>	
413H9F8_LC-V3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSSQSL</u> LN <u>GNQKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYGASTRES</u> GV PDRFIGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFC <u>Q</u> N <u>DLFYPLTFGGGKVEIK</u>	87
413H9F8_LC-V4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIS <u>CKSSQSL</u> LN <u>GNQKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYGASTRES</u> GV PDRFIGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFC <u>Q</u> N <u>DLFYPLTFGAGTKVEIK</u>	88
364D1A7_HC_V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSS</u> F <u>GMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSGSIYYAD</u> TV <u>KGRFTISRDN</u> AKNSLYLQMN <u>SLRAEDTAV</u> YYC <u>ATSYYYGNALEYWGQTTVT</u> VSS	89
364D1A7_HC_V2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSS</u> F <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGSIYYAD</u> TV <u>KGRFTISRDN</u> PKNSLYLQMN <u>SLRAEDTAV</u> YYC <u>ATSYYYGNALEYWGQTTVT</u> VSS	90
364D1A7_HC_V3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSS</u> F <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGSIYYAD</u> TV <u>KGRFTLSRDN</u> PKNSLYLQMN <u>SLRAEDTAV</u> YYC <u>ATSYYYGNALEYWGQTTVT</u> VSS	91
364D1A7_HC_V4	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSS</u> F <u>GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGSIYYAD</u> TV <u>KGRFTLSRDN</u> PKNTLYLQMN <u>SLRAEDTAV</u> YYC <u>ATSYYYGNALEYWGQTTVT</u> VSS	92
364D1A7_LC_V1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSSQSL</u> FNV <u>GNQKNYL</u> TWYQOKPGQPPKLLIY <u>WASTR</u> KSGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY <u>YCQ</u> N <u>VYSYPLTFGGGKVEIK</u>	93
364D1A7_LC_V2	DIVLTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSSQSL</u> FNV	94

	<u>GNQKNYLTWYQQKPGQTPKLLIYWASTRKSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYC <u>QN</u> <u>VYSYPLTFGGGKVEIK</u>	
364D1A7_LC_V3	DVVLTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSSQSLFNV</u> <u>GNQKNYLTWYQQKPGQTPKLLIYWASTRKSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYC <u>QN</u> <u>VYSYPLTFGGGKVEIK</u>	95
364D1A7_LC_V4	DVVLTQSPDSLAVSLGERATIS <u>CKSSQSLFNV</u> <u>GNQKNYLTWYQQKPGQTPLLIYWASTRKSGV</u> PDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYC <u>QN</u> <u>VYSYPLTFGGGKVEIK</u>	96
364D1A7_LC_V5	DVVLTQSPDSLAVSLGERATIS <u>CKSSQSLFNV</u> <u>GNQKNYLTWYQQKPGQTPLLIYWASTRKSGV</u> PDRFTGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYC <u>QN</u> <u>VYSYPLTFGAGKVEIK</u>	97

[00120] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma região VH e uma região VL como ilustradas na Tabela 6.

	<b>282A12_VH g0</b> (ID. DE SEQ. N°: 65)	<b>282A12_VH g1</b> (ID. DE SEQ. N°: 66)	<b>282A12_VH g2</b> (ID. DE SEQ. N°: 67)	<b>282A12_VH g3</b> (ID. DE SEQ. N°: 68)
<b>282A12_VL g0</b> (ID. DE SEQ. N°: 69)	hz282-1 (ID. DE SEQ. N°: 65 + ID. DE SEQ. N°: 69)	hz282-2 (ID. DE SEQ. N°: 66 + ID. DE SEQ. N°: 69)	hz282-3 (ID. DE SEQ. N°: 67 + ID. DE SEQ. N°: 69)	hz282-4 (ID. DE SEQ. N°: 68 + ID. DE SEQ. N°: 69)
<b>282A12_VL g1</b> (ID. DE SEQ. N°: 70)	hz282-5 (ID. DE SEQ. N°: 65 + ID. DE SEQ. N°: 70)	hz282-6 (ID. DE SEQ. N°: 66 + ID. DE SEQ. N°: 70)	hz282-7 (ID. DE SEQ. N°: 67 + ID. DE SEQ. N°: 70)	hz282-8 (ID. DE SEQ. N°: 68 + ID. DE SEQ. N°: 70)
<b>282A12_VL g2</b> (ID. DE SEQ. N°: 71)	hz282-9 (ID. DE SEQ. N°: 65 + ID. DE SEQ. N°: 71)	hz282-10 (ID. DE SEQ. N°: 66 + ID. DE SEQ. N°: 71)	hz282-11 (ID. DE SEQ. N°: 67 + ID. DE SEQ. N°: 71)	hz282-12 (ID. DE SEQ. N°: 68 + ID. DE SEQ. N°: 71)
<b>282A12_VL g3</b>	hz282-13	hz282-14	hz282-15	hz282-16

<b>(ID. DE SEQ. Nº: 72)</b>	(ID. DE SEQ. Nº: 65 + ID. DE SEQ. Nº: 72)	(ID. DE SEQ. Nº: 66 + ID. DE SEQ. Nº: 72)	(ID. DE SEQ. Nº: 67 + ID. DE SEQ. Nº: 72)	(ID. DE SEQ. Nº: 68 + ID. DE SEQ. Nº: 72)
<b>282A12_VL g4</b>  <b>(ID. DE SEQ. Nº: 73)</b>	hz282-17  (ID. DE SEQ. Nº: 65 + ID. DE SEQ. Nº: 73)	hz282-18  (ID. DE SEQ. Nº: 66 + ID. DE SEQ. Nº: 73)	hz282-19  (ID. DE SEQ. Nº: 67 + ID. DE SEQ. Nº: 73)	hz282-20  (ID. DE SEQ. Nº: 68 + ID. DE SEQ. Nº: 73)

[00121] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma região VH e uma região VL como ilustradas na Tabela 7.

	<b>413H9F8_VH g0</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 74)</b>	<b>413H9F8_VH g1</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 75)</b>	<b>413H9F8_VH g2</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 76)</b>
<b>413H9F8_VL g0</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 77)</b>	413H9F8-cp1 (ID. DE SEQ. N°: 74 + ID. DE SEQ. N°: 77)	413H9F8-cp2 ID. DE SEQ. N°: 75 + ID. DE SEQ. N°: 77)	413H9F8-cp3 ID. DE SEQ. N°: 76 + ID. DE SEQ. N°: 77)
<b>413H9F8_VL g1</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 78)</b>	413H9F8-cp4 (ID. DE SEQ. N°: 74 + ID. DE SEQ. N°: 78)	413H9F8-cp5 (ID. DE SEQ. N°: 75 + ID. DE SEQ. N°: 78)	413H9F8-cp6 (ID. DE SEQ. N°: 76 + ID. DE SEQ. N°: 78)
<b>413H9F8_VL g2</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 79)</b>	413H9F8-cp7 (ID. DE SEQ. N°: 74 + ID. DE SEQ. N°: 79)	413H9F8-cp8 (ID. DE SEQ. N°: 75 + ID. DE SEQ. N°: 79)	413H9F8-cp9 (ID. DE SEQ. N°: 76 + ID. DE SEQ. N°: 79)
<b>413H9F8_VL g3</b> <b>(ID. DE SEQ. N°: 80)</b>	413H9F8-cp10 (ID. DE SEQ. N°: 74 + ID. DE SEQ. N°: 80)	413H9F8-cp11 (ID. DE SEQ. N°: 75 + ID. DE SEQ. N°: 80)	413H9F8-cp12 (ID. DE SEQ. N°: 76 + ID. DE SEQ. N°: 80)

[00122] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma região VH e uma região VL como ilustradas na Tabela 8.

	<b>413H9F8_LC-V1</b> (ID. DE SEQ. N°: 85)	<b>413H9F8_LC-V2</b> (ID. DE SEQ. N°: 86)	<b>413H9F8_LC-V3</b> (ID. DE SEQ. N°: 87)	<b>413H9F8_LC-V4</b> (ID. DE SEQ. N°: 88)
<b>413H9F8_H</b> <b>C-V1</b> (ID. DE SEQ. N°: 81)	413H9F8-H1L1 (ID. DE SEQ. N°: 85 + ID. DE SEQ. N°: 81)	413H9F8-H1L2 (ID. DE SEQ. N°: 86 + ID. DE SEQ. N°: 81)	413H9F8-H1L3 (ID. DE SEQ. N°: 87 + ID. DE SEQ. N°: 81)	413H9F8-H1L4 (ID. DE SEQ. N°: 88 + ID. DE SEQ. N°: 81)
<b>413H9F8_H</b> <b>C-V2</b> (ID. DE SEQ. N°: 82)	413H9F8-H2L1 (ID. DE SEQ. N°: 85 + ID. DE SEQ. N°: 82)	413H9F8-H2L2 (ID. DE SEQ. N°: 86 + ID. DE SEQ. N°: 82)	413H9F8-H2L3 (ID. DE SEQ. N°: 87 + ID. DE SEQ. N°: 82)	413H9F8-H2L4 (ID. DE SEQ. N°: 88 + ID. DE SEQ. N°: 82)
<b>413H9F8_H</b> <b>C-V3</b> (ID. DE SEQ. N°: 83)	413H9F8-H3L1 (ID. DE SEQ. N°: 85 + ID. DE SEQ. N°: 83)	413H9F8-H3L1 (ID. DE SEQ. N°: 86 + ID. DE SEQ. N°: 83)	413H9F8-H3L1 (ID. DE SEQ. N°: 87 + ID. DE SEQ. N°: 83)	413H9F8-H3L1 (ID. DE SEQ. N°: 88 + ID. DE SEQ. N°: 83)
<b>413H9F8_H</b>	413H9F8-H4L1	413H9F8-H4L2	413H9F8-H4L3	413H9F8-H4L4

<b>C-V4</b> <b>(ID. DE</b> <b>SEQ. N°:</b> <b>84)</b>	(ID. DE SEQ. N°: 85 + ID. DE SEQ. N°: 84)	(ID. DE SEQ. N°: 86 + ID. DE SEQ. N°: 84)	(ID. DE SEQ. N°: 87 + ID. DE SEQ. N°: 84)	(ID. DE SEQ. N°: 88 + ID. DE SEQ. N°: 84)
--	---	---	---	---

[00123] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma região VH e uma região VL como ilustradas na Tabela 9.

	<b>364D1A7_LC_V1</b> (ID. DE SEQ. N°: 93)	<b>364D1A7_LC_V2</b> (ID. DE SEQ. N°: 94)	<b>364D1A7_LC_V3</b> (ID. DE SEQ. N°: 95)	<b>364D1A7_LC_V4</b> (ID. DE SEQ. N°: 96)	<b>364D1A7_LC_V5</b> (ID. DE SEQ. N°: 97)
<b>364D1A7_HC_V</b> <b>1</b> (ID. DE SEQ. N°: 89)	364D1A7_H1L1 (ID. DE SEQ. N°: 93 + ID. DE SEQ. N°: 89)	364D1A7_H1L2 (ID. DE SEQ. N°: 94 + ID. DE SEQ. N°: 89)	364D1A7_H1L3 (ID. DE SEQ. N°: 95 + ID. DE SEQ. N°: 89)	364D1A7_H1L4 (ID. DE SEQ. N°: 96 + ID. DE SEQ. N°: 89)	364D1A7_H1L5 (ID. DE SEQ. N°: 97 + ID. DE SEQ. N°: 89)
<b>364D1A7_HC_V</b> <b>2</b> (ID. DE SEQ. N°: 90)	364D1A7_H2L1 (ID. DE SEQ. N°: 93 + ID. DE SEQ. N°: 90)	364D1A7_H2L2 (ID. DE SEQ. N°: 94 + ID. DE SEQ. N°: 90)	364D1A7_H2L3 (ID. DE SEQ. N°: 95 + ID. DE SEQ. N°: 90)	364D1A7_H2L4 (ID. DE SEQ. N°: 96 + ID. DE SEQ. N°: 90)	364D1A7_H2L5 (ID. DE SEQ. N°: 97 + ID. DE SEQ. N°: 90)
<b>364D1A7_HC_V</b> <b>3</b> (ID. DE SEQ. N°: 91)	364D1A7_H3L1 (ID. DE SEQ. N°: 93 + ID. DE SEQ. N°: 91)	364D1A7_H3L2 (ID. DE SEQ. N°: 94 + ID. DE SEQ. N°: 91)	364D1A7_H3L3 (ID. DE SEQ. N°: 95 + ID. DE SEQ. N°: 91)	364D1A7_H3L4 (ID. DE SEQ. N°: 96 + ID. DE SEQ. N°: 91)	364D1A7_H3L5 (ID. DE SEQ. N°: 97 + ID. DE SEQ. N°: 91)
<b>364D1A7_HC_V</b>	364D1A7_H4L1	364D1A7_H4L2	364D1A7_H4L3	364D1A7_H4L4	364D1A7_H4L5

<b>4</b> <b>(ID. DE SEQ.</b> <b>Nº: 92)</b>	(ID. DE SEQ. Nº: 93 + ID. DE SEQ. Nº: 92)	(ID. DE SEQ. Nº: 94 + ID. DE SEQ. Nº: 92)	(ID. DE SEQ. Nº: 95 + ID. DE SEQ. Nº: 92)	(ID. DE SEQ. Nº: 96 + ID. DE SEQ. Nº: 92)	(ID. DE SEQ. Nº: 97 + ID. DE SEQ. Nº: 92)
---	--	--	--	--	--

[00124] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo compreende uma região de arcabouço selecionada de IgM, IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), IgA ou IgE. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgM. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4). Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG1. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG2.

[00125] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma ou mais mutações na região de arcabouço, por exemplo, no domínio CH1, domínio CH2, domínio CH3, região de dobradiça, ou uma combinação destes. Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações modulam interações do receptor Fc, por exemplo, para aumentar funções efetoras de Fc como, por exemplo, ADCC e/ou citotoxicidade complemento-dependente (CDC). Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações estabilizam o anticorpo e/ou aumentam a meia-vida do anticorpo. Em casos adicionais, as (uma ou mais) mutações modulam a glicosilação.

[00126] Em algumas modalidades, a região Fc compreende uma ou mais mutações que modulam interações do receptor Fc, por exemplo, para aumentar as funções efetoras como, por exemplo, ADCC e/ou CDC. Nesses casos, resíduos exemplares quando mutados modulam funções efetoras incluem S239, F243, R292, Y300, V305, P396, K326, A330, I332 ou E333, nos quais a posição do resíduo corresponde à IgG1 e a numeração do resíduo está de acordo com a numeração de Kabat (índice EU de Kabat e *cols.*, 1991 "Sequences of Proteins of

Immunological Interest"). Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações compreendem S239D, F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, K326W, A330L, I332E, E333A, E333S, ou uma combinação destas. Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações compreendem S239D, I332E, ou uma combinação destas. Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações compreende F243L, R292P, Y300L, V305I, P396L, I332E, ou uma combinação destas. Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações compreendem S239D, A330L, I332E, ou uma combinação destas. Em alguns casos, as (uma ou mais) mutações compreendem K326W, E333S, ou uma combinação destas. Em alguns casos, a mutação compreende E333A.

[00127] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 compartilha um epítipo de ligação com o anticorpo de referência 175D10.

[00128] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 possui uma atividade de ligação cruzada com a proteína CLDN18.2 de camundongo e de *Cynomolgus*.

#### **Produção de anticorpo**

[00129] Em algumas modalidades, anticorpos anti-CLDN18.2 são provocados por protocolo-padrão por injeção de um animal de produção com uma composição antigênica. Veja, por exemplo, Harlow e Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Quando se utiliza uma proteína inteira, ou uma seção maior da proteína, anticorpos podem ser provocados por imunização do animal de produção com a proteína e um adjuvante adequado (por exemplo, de Freund, completo de Freund, emulsões óleo-em-água etc.). Quando um peptídeo menor é utilizado, é vantajoso conjugar o peptídeo com uma molécula maior para fazer um conjugado

imunoestimulante. Proteínas conjugadas comumente utilizadas que estão comercialmente disponíveis para esse uso incluem albumina sérica bovina (BSA) e hemocianina *keyhole limpet* (KLH). A fim de despertar anticorpos para epitopos particulares, podem ser utilizados peptídeos derivados da sequência completa. Alternativamente, a fim de gerar anticorpos para porções de peptídeo relativamente curtas da proteína-alvo, uma resposta imune superior pode ser provocada se o polipeptídeo é unido a uma proteína transportadora como, por exemplo, ovalbumina, BSA ou KLH.

[00130] Anticorpos policlonais ou monoclonais anti-CLDN18.2 podem ser produzidos por animais que foram geneticamente alterados para produzir imunoglobulinas humanas. Um animal transgênico pode ser produzido por produção inicial de um animal "knock-out" que não produz os anticorpos naturais do animal, e transformando-se estavelmente o animal com um locus de anticorpo humano (por exemplo, pelo uso de um cromossomo humano artificial). Nesses casos, somente anticorpos humanos são então feitos pelo animal. Técnicas para a geração desses animais, e derivação de anticorpos por eles, são descritas nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 6.162.963 e 6.150.584, incorporadas integralmente nesse relatório descritivo por referência. Esses anticorpos podem ser referidos como anticorpos xenogênicos humanos.

[00131] Alternativamente, anticorpos anti-CLDN18.2 podem ser produzidos a partir de bibliotecas de fagos que contêm regiões variáveis humanas. Veja a Patente U.S. N<sup>o</sup> 6.174.708, incorporada integralmente nesse relatório descritivo por referência.

[00132] Em alguns aspectos de qualquer uma das

modalidades reveladas nesse relatório descritivo, um anticorpo anti-CLDN18.2 é produzido por um hibridoma.

[00133] Para anticorpos monoclonais anti-CLDN18.2, hibridomas podem ser formados por isolamento das células imunes estimuladas, tais como aquelas do baço do animal inoculado. Essas células podem então ser fundidas a células imortalizadas, por exemplo, células de mieloma ou células transformadas, que são capazes de replicar indefinidamente em cultura de células produzindo, dessa forma, uma linhagem de células secretoras de imunoglobulina, imortal. A linhagem de célula imortal utilizada pode ser selecionada para ser deficiente em enzimas necessárias para a utilização de certos nutrientes. Muitas dessas linhagens de células (por exemplo, mielomas) são conhecidas por aqueles habilitados na técnica, e incluem, por exemplo: timidina quinase (TK) ou hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT). Essas deficiências permitem a seleção para células fundidas de acordo com sua habilidade para crescer, por exemplo, em meio de hipoxantina aminopterina-timidina (HAT).

[00134] Além disso, o anticorpo anti-CLDN18.2 pode ser produzido por engenharia genética.

[00135] Os anticorpos anti-CLDN18.2 revelados nesse relatório descritivo podem ter uma propensão reduzida para induzir uma resposta imune indesejada em humanos, por exemplo, choque anafilático, e também podem exibir uma propensão reduzida para sensibilização de uma resposta imune que impedisse dosagem repetida com um agente de anticorpo terapêutico ou de imageamento (por exemplo, a resposta de anticorpo humano anti-murídea "HAMA"). Esses anticorpos anti-CLDN18.2 incluem, sem limitação, anticorpos anti-

CLDN18.2 humanizados, quiméricos ou xenogênicos humanos.

[00136] Anticorpos quiméricos anti-CLDN18.2 podem ser feitos, por exemplo, por meios recombinantes por combinação das regiões variáveis da cadeia leve e pesada (VK e VH) murídeas, obtidas de um clone de hibridoma murídeo (ou derivado de outro animal), com as regiões constantes da cadeia leve e pesada humanas, a fim de produzir um anticorpo com domínios predominantemente humanos. A produção desses anticorpos quiméricos é bem conhecida na técnica, e pode ser obtida por meios padronizados (como descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.624.659, incorporada integralmente nesse relatório descritivo por referência).

[00137] O termo "humanizado", como se aplica aos anticorpos não humanos (por exemplo, de roedor ou primata), são imunoglobulinas híbridas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos destas que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maioria das vezes, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), por exemplo, camundongo, rato, coelho ou primata, que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos da região de arcabouço (FR) Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, o anticorpo humanizado pode compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo receptor nem nas sequências da CDR ou do arcabouço importadas. Essas modificações são feitas para refinar e otimizar ainda mais a performance do anticorpo

e minimizar a imunogenicidade quando introduzido em um corpo humano. Em alguns exemplos, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente tudo de pelo menos um e, tipicamente, dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana.

[00138] Anticorpos humanizados podem ser modificados geneticamente para conter domínios de imunoglobulina do tipo humanos, e incorporam somente as regiões determinantes de complementaridade do anticorpo derivado do animal. Isso pode ser obtido examinando-se cuidadosamente a sequência das alças hipervariáveis das regiões variáveis de uma unidade de ligação ao antígeno monoclonal ou anticorpo monoclonal, e ajustando-as à estrutura de uma unidade de ligação ao antígeno humana ou cadeias de anticorpo humano. Veja, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.187.287, incorporada integralmente nesse relatório descritivo por referência.

[00139] Métodos para a humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. Anticorpos "humanizados" são anticorpos nos quais pelo menos parte da sequência foi alterada de sua forma inicial para torná-la mais semelhante às imunoglobulinas humanas. Em algumas versões, as regiões constantes (C) da cadeia pesada (H) e da cadeia leve (L) são substituídas com sequência humana. Essa pode ser um polipeptídeo de fusão que compreende uma região

variável (V) e uma região C de imunoglobulina heteróloga. Em algumas versões, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) compreendem sequências de anticorpo não humano, enquanto as regiões de arcabouço V também foram convertidas em sequências humanas. Veja, por exemplo, EP 0329400. Em algumas versões, as regiões V são humanizadas por design de sequências de consenso de regiões V humanas e de camundongo, e conversão de resíduos fora das CDRs que são diferentes entre as sequências de consenso.

[00140] Em princípio, uma sequência do arcabouço de um anticorpo humanizado pode servir como o modelo para enxerto de CDR; no entanto, foi demonstrado que a substituição direta de CDR em um arcabouço desse tipo pode levar a uma perda significativa de afinidade de ligação ao antígeno. Glaser e cols. (1992) *J. Immunol.* 149: 2.606; Tempest e cols. (1992) *Biotechnology* 9: 266; e Shalaby e cols. (1992) *J. Exp. Med.* 17: 217. Quanto mais homólogo é um anticorpo humano (HuAb) para o anticorpo murídeo (muAb) original, o menos provável é que o arcabouço humano introduzirá distorções nas CDRs murídeas que possam reduzir a afinidade. Com base em uma pesquisa de homologia de sequência contra um banco de dados de sequências de anticorpo, o HuAb IC4 fornece boa homologia de arcabouço para muM4TS.22, embora outros HuAbs altamente homólogos também fossem adequados, especialmente cadeias L kappa do subgrupo humano I ou cadeias H do subgrupo humano III. Kabat e cols. (1987). Vários programas de computador como, por exemplo, ENCAD (Levitt e cols. (1983) *J. Mol. Biol.* 168: 595), estão disponíveis para prever a sequência ideal para a região V. A invenção, dessa forma, engloba HuAbs com diferentes regiões variáveis (V). Faz parte

dos conhecimentos daqueles habilitados na técnica determinar sequências da região V adequadas e otimizar essas sequências. Métodos para a obtenção de anticorpos com imunogenicidade reduzida também estão descritos na Patente U.S. Nº 5.270.202 e em EP 699.755.

[00141] Anticorpos humanizados podem ser preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Aqueles habilitados na técnica estão familiarizados com modelos tridimensionais de imunoglobulina. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensional prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção dessas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, ou seja, a análise de resíduos que influenciam a habilidade da imunoglobulina candidata para se ligar ao seu antígeno. Dessa forma, resíduos da FR podem ser selecionados e combinados da sequência de consenso e importada de modo que a característica de anticorpo desejada, por exemplo, afinidade aumentada para o antígeno-alvo (ou antígenos), seja obtida.

[00142] Um processo para a humanização de unidades de ligação ao antígeno específicas pode ser como descrito a seguir. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves aceitadoras da linhagem germinativa de melhor ajuste são selecionadas com base na homologia, estrutura canônica e propriedades físicas das linhagens germinativas do anticorpo humano para enxerto. A modelagem por computador de mVH/VL

versus hVH/VL enxertada é realizada e uma sequência de anticorpo humanizado prototípica é gerada. Se a modelagem indicasse uma necessidade para retromutações do arcabouço, uma segunda variante com as alterações da FW indicadas era gerada. Fragmentos de DNA que codificam os arcabouços da linhagem germinativa e CDRs muríneas selecionados são sintetizados. Os fragmentos de DNA sintetizados são subclonados em vetores de expressão de IgG e as sequências são confirmadas por sequenciamento de DNA. Os anticorpos humanizados são expressos em células, por exemplo, 293F, e as proteínas são testadas, por exemplo, em ensaios de fagocitose MDM e ensaios de ligação ao antígeno. As unidades de ligação ao antígeno humanizadas são comparadas com unidades de ligação ao antígeno parentais em afinidade de ligação ao antígeno, por exemplo, por FACS, em células que expressam o antígeno-alvo. Se a afinidade é maior do que 2 vezes menor do que a unidade de ligação ao antígeno parental, uma segunda rodada de variantes humanizadas pode ser gerada e testada como descrito acima.

[00143] Como observado acima, um anticorpo anti-CLDN18.2 pode ser "monovalente" ou "multivalente". Enquanto o primeiro possui um sítio de ligação por unidade de ligação ao antígeno, o último contém múltiplos sítios de ligação capazes de ligação a mais de um antígeno do mesmo tipo ou de tipos diferentes. Dependendo do número de sítios de ligação, as unidades de ligação ao antígeno podem ser bivalentes (com dois sítios de ligação ao antígeno), trivalentes (com três sítios de ligação ao antígeno), tetravalentes (com quatro sítios de ligação ao antígeno), e assim por diante.

[00144] Anticorpos anti-CLDN18.2 multivalentes podem

ainda ser classificados com base em suas especificidades de ligação. Um anticorpo anti-CLDN18.2 "monoespecífico" é uma molécula capaz de ligação a um ou mais antígenos do mesmo tipo. Um anticorpo anti-CLDN18.2 "multiespecífico" é uma molécula que possui especificidades de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. Embora essas moléculas normalmente se ligarão somente a dois antígenos distintos (ou seja, anticorpos anti-CLDN18.2 biespecíficos), anticorpos com especificidades adicionais como, por exemplo, anticorpos triespecíficos, estão englobados por essa expressão quando usada nesse relatório descritivo. Essa revelação ainda fornece anticorpos anti-CLDN18.2 multiespecíficos. Anticorpos anti-CLDN18.2 multiespecíficos são moléculas multivalentes capazes de ligação a pelo menos dois antígenos distintos, por exemplo, moléculas biespecíficas e triespecíficas que exibem especificidades de ligação para dois e três antígenos distintos, respectivamente.

#### **Polinucleotídeos e vetores**

[00145] Em algumas modalidades, a presente revelação fornece ácidos nucleicos isolados que codificam qualquer um dos anticorpos anti-CLDN18.2 revelados nesse relatório descritivo. Em outra modalidade, a presente revelação fornece vetores que compreendem uma sequência de ácidos nucleicos que codifica qualquer anticorpo anti-CLDN18.2 revelado nesse relatório descritivo. Em algumas modalidades, essa invenção fornece ácidos nucleicos isolados que codificam uma CDR da cadeia leve e uma CDR da cadeia pesada de um anticorpo anti-CLDN18.2 revelado nesse relatório descritivo.

[00146] Os anticorpos anti-CLDN18.2 em questão podem ser preparados por tecnologia de DNA recombinante, técnicas de química sintética, ou uma combinação destas. Por exemplo, sequências que codificam os componentes desejados dos anticorpos anti-CLDN18.2, incluindo CDRs da cadeia leve e CDRs da cadeia pesada, são tipicamente montados clonados em um vetor de expressão com o uso de metodologias moleculares padronizadas conhecidas na técnica. Essas sequências podem ser montadas por outros vetores que codificam a sequência de proteína desejada, a partir de fragmentos gerados por PCR com o uso dos respectivos ácidos nucleicos-modelos, ou por montagem de oligonucleotídeos sintéticos que codificam as sequências desejadas. Sistemas de expressão podem ser criados por transfecção de uma célula adequada com um vetor de expressão que compreende um anticorpo anti-CLDN18.2 de interesse.

[00147] Sequências de nucleotídeos que correspondem a várias regiões de cadeias leves ou pesadas de um anticorpo existente podem ser prontamente obtidas e sequenciadas com o uso de técnicas convencionais que incluem, sem limitação, hibridização, PCR e sequenciamento de DNA. Células de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais servem como uma fonte preferida de sequências de nucleotídeos de anticorpo. Um grande número de células de hibridoma que produzem um arranjo de anticorpos monoclonais pode ser obtido de repositórios públicos ou privados. O maior agente de depósito é a "American Type Culture Collection" ([atcc.org](http://atcc.org)), que oferece uma coleção diversa de linhagens de células de hibridoma bem caracterizadas. Alternativamente, nucleotídeos de anticorpos podem ser obtidos de roedores ou humanos

imunizados ou não imunizados, e formam órgãos como, por exemplo, baço e linfócitos do sangue periférico. Técnicas específicas aplicáveis para a extração e síntese de nucleotídeos de anticorpos são descritas em Orlandi e cols. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86: 3.833-3.837; Larrick e cols. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1.250-1.255; Sastry e cols. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86: 5.728-5.732; e Patente U.S. N° 5.969.108.

[00148] Polinucleotídeos que codificam anticorpos anti-CLDN18.2 também podem ser modificados, por exemplo, por substituição da sequência codificadora de regiões constantes da cadeia pesada e leve humanas no lugar das sequências homólogas não humanas. Dessa forma, são preparados anticorpos quiméricos que retêm a especificidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 original.

[00149] Também é subentendido que os polinucleotídeos exemplificados na revelação incluem aqueles que codificam equivalentes funcionais e fragmentos destes dos polipeptídeos exemplificados. Polipeptídeos funcionalmente equivalentes incluem aqueles que aumentam, diminuem ou não afetam significativamente as propriedades dos polipeptídeos por eles codificados. Equivalentes funcionais podem ser polipeptídeos que possuem substituições de aminoácidos conservativas, análogos, incluindo fusões e mutantes.

[00150] Em função da degenerescência do código genético, pode haver variação considerável em nucleotídeos de uma sequência codificadora da unidade de ligação ao antígeno, bem como sequências adequadas para a construção dos polinucleotídeos e vetores da presente invenção. Variantes de sequência podem ter sequências de DNA ou aminoácidos

modificados, uma ou mais substituições, deleções ou adições, cujo efeito líquido é reter a atividade de ligação ao antígeno desejada. Por exemplo, várias substituições podem ser feitas na região codificadora que não alteraram os aminoácidos codificados ou resultam em alterações conservativas. Essas substituições estão englobadas pela presente invenção. Substituições de aminoácidos conservativas incluem substituições dentro dos seguintes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutâmico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; e fenilalanina, tirosina. Embora substituições conservativas alterem eficazmente um ou mais resíduos de aminoácidos contidos no polipeptídeo a ser produzido, não é esperado que as substituições interfiram com a atividade de ligação ao antígeno das unidades de ligação ao antígeno resultantes a serem produzidas. Substituições de nucleotídeos que não alteram os resíduos de aminoácidos codificados são úteis para otimização da expressão gênica em diferentes sistemas. Substituições adequadas são conhecidas por aqueles habilitados na técnica e são feitas, por exemplo, para refletir o uso de códons preferido nos sistemas de expressão.

[00151] Quando desejado, os polinucleotídeos recombinantes podem compreender sequências heterólogas que facilitam a detecção da expressão e purificação do produto gênico. Exemplos dessas sequências são conhecidos na técnica e incluem aquelas que codificam proteínas repórteres como, por exemplo,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -lactamase, cloranfenicol acetiltransferase (CAT), luciferase, proteína fluorescente verde (GFP) e seus derivados. Outras sequências heterólogas

que facilitam a purificação podem codificar epítopos como, por exemplo, Myc, HA (derivada da hemaglutinina do vírus influenza), His-6, FLAG, ou a porção Fc de imunoglobulina, glutational S-transferase (GST), e proteína de ligação à maltose (MBP).

[00152] Os polinucleotídeos revelados nesse relatório descritivo podem ser conjugados a diversas porções quimicamente funcionais descritas acima. Porções comumente empregadas incluem marcadores capazes de produzir um sinal detectável, peptídeos sinalizadores, agentes que aumentam a reatividade imunológica, agentes que facilitam o acoplamento a um suporte sólido, carreadores de vacinas, modificadores da resposta biológica, marcadores paramagnéticos e fármacos. As porções podem estar ligadas covalentemente ao polinucleotídeo recombinantemente ou por outros meios conhecidos na técnica.

[00153] Os polinucleotídeos revelados nesse relatório descritivo podem compreender sequências adicionais, por exemplo, sequências codificadoras adicionais dentro da mesma unidade de transcrição, elementos de controle como, por exemplo, promotores, sítios de ligação ao ribossomo, e sítios poliadenilação, unidades de transcrição adicionais sob o controle do mesmo promotor ou de um promotor diferente, sequências que permitem clonagem, expressão e transformação de uma célula hospedeira, e qualquer construção desse tipo, como pode ser desejável para fornecer modalidades dessa invenção.

[00154] Os polinucleotídeos revelados nesse relatório descritivo podem ser obtidos usando síntese química, métodos de clonagem recombinante, PCR, ou qualquer combinação

destes. Métodos de síntese química de polinucleotídeos são bem conhecidos na técnica e não precisam ser descritos em detalhe nesse relatório descritivo. Aqueles habilitados na técnica podem usar os dados de sequências fornecidos nesse relatório descritivo para obter um polinucleotídeo desejado por emprego de um sintetizador de DNA ou solicitando a um serviço comercial.

[00155] Polinucleotídeos que compreendem uma sequência desejada podem ser inseridos em um vetor adequado que, por sua vez, pode ser introduzido em uma célula hospedeira adequada para replicação e amplificação. Conseqüentemente, diversos vetores que compreendem um ou mais dos polinucleotídeos descritos acima são contemplados nesse relatório descritivo. Também são fornecidas bibliotecas selecionáveis de vetores de expressão que compreendem pelo menos um vetor que codifica um anticorpo anti-CLDN18.2 revelado nesse relatório descritivo.

[00156] Vetores geralmente compreendem sequências de controle da transcrição ou da tradução necessárias para expressão das unidades de ligação ao antígeno. Sequências de controle da transcrição ou da tradução adequadas incluem, sem limitação, origem de replicação, promotor, intensificador, regiões repressoras da ligação, sítios de iniciação da transcrição, sítios de ligação ao ribossomo, sítios de iniciação da tradução, e sítios de terminação da transcrição e tradução.

[00157] A escolha de promotores dependerá, em grande parte, das células hospedeiras nas quais o vetor é introduzido. Também é possível utilizar promotores normalmente associados a um gene da cadeia leve ou pesada

desejado, desde que essas sequências de controle sejam compatíveis com o sistema da célula hospedeira. Promotores célula-específicos ou tecido-específicos também podem ser usados. Uma grande diversidade de promotores tecido-específicos foi descrita e empregada por profissionais no campo. Promotores exemplares operativos em células animais seletivas incluem promotores hepatócitos-específicos e promotores específicos para o músculo cardíaco. Dependendo da escolha dos tipos de célula receptora, aqueles habilitados na técnica conhecerão outros promotores célula-específicos ou tecido-específicos aplicáveis para a construção dos vetores de expressão da presente invenção.

[00158] Com o uso de técnicas conhecidas de clonagem molecular ou de engenharia genética, sequências de controle da transcrição apropriadas, intensificadores, terminadores, ou quaisquer outros elementos genéticos conhecidos na técnica podem ser integrados em relacionamento operativo, opcionalmente adicionalmente com genes de fusão selecionáveis intactos a serem expressos de acordo com a presente invenção. Além dos elementos descritos acima, os vetores podem conter um marcador selecionável (por exemplo, um gene que codifica uma proteína necessária à sobrevivência ou crescimento de uma célula hospedeira transformada com o vetor), embora esse gene marcador possa ser realizado em outra sequência de polinucleotídeos co-introduzida na célula hospedeira.

[00159] Os polinucleotídeos e vetores descritos nesse relatório descritivo possuem vários usos específicos. Eles são úteis, por exemplo, em sistemas de expressão para a produção de unidades de ligação ao antígeno. Esses

polinucleotídeos são úteis como iniciadores para efetuar a amplificação de polinucleotídeos desejados. Além disso, os polinucleotídeos também são úteis em composições farmacêuticas que incluem vacinas, agentes diagnósticos e fármacos.

[00160] As células hospedeiras podem ser usadas, *inter alia*, como repositórios dos polinucleotídeos em questão, vetores, ou como veículos para a produção e avaliação de anticorpos anti-CLDN18.2 desejados com base em suas especificidades de ligação ao antígeno.

[00161] Consequentemente, a revelação fornece um método de identificação de um anticorpo anti-CLDN18.2 que é imunorreativo com um antígeno desejado. Esse método pode envolver as seguintes etapas: (a) preparação de uma biblioteca geneticamente diversa de anticorpos anti-CLDN18.2, em que a biblioteca compreende pelo menos um anticorpo anti-CLDN18.2 em questão; (b) o contato da biblioteca de anticorpos anti-CLDN18.2 com o antígeno desejado; (c) detecção de uma ligação específica entre anticorpos anti-CLDN18.2 e o antígeno identificando, dessa forma, o anticorpo anti-CLDN18.2 que é imunorreativo com o antígeno desejado.

[00162] A habilidade de um anticorpo anti-CLDN18.2 para se ligar especificamente a um antígeno desejado pode ser testada por diversos procedimentos bem estabelecidos na técnica. Veja Harlow e Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nova York; Gherardi e cols. (1990) *J. Immunol. Meth.* 126: 61-68. Tipicamente, anticorpos anti-CLDN18.2 que exibem especificidades de ligação desejadas podem ser detectados diretamente por

imunoensaios, por exemplo, por reação de anticorpos anti-CLDN18.2 marcados com os antígenos que estão imobilizados em um suporte ou substrato sólido. Em geral, o substrato ao qual o antígeno é aderido é fabricado com um material que exibe um nível baixo de ligação não específica durante o imunoensaio. Um exemplo de suporte sólido é feito de um ou mais dos seguintes tipos de materiais: polímeros plásticos, vidro, celulose, nitrocelulose, material semicondutor e metal. Em alguns exemplos, o substrato consiste em uma placa de Petri, microesferas de cromatografia, microesferas magnéticas e semelhantes.

[00163] Para esses ensaios de fase sólida, os anticorpos anti-CLDN18.2 não reagidos são removidos por lavagem. Em um ensaio de fase líquida, no entanto, os anticorpos anti-CLDN18.2 não reagidos são removidos por alguma outra técnica de separação, por exemplo, filtração ou cromatografia. Após ligação do antígeno aos anticorpos anti-CLDN18.2 marcados, a quantidade de marcador ligado é determinada. Uma variação dessa técnica é um ensaio competitivo, no qual o antígeno é ligado até a saturação com uma molécula de ligação original. Quando uma população do anticorpo anti-CLDN18.2 em questão é introduzida ao complexo, somente aqueles que exibem afinidade de ligação maior serão capazes de competir e permanecerem, dessa forma, ligados ao antígeno.

[00164] Alternativamente, a ligação específica a certo antígeno pode ser avaliada por separação de células, o que envolve a apresentação do antígeno desejado nas células a serem separadas, e depois a marcação das células-alvo com anticorpos anti-CLDN18.2 que estão acoplados a agentes detectáveis, seguida por separação das células marcadas

daquelas não marcadas em um separador de células. Um método sofisticado de separação de células é a separação de células ativada por fluorescência (FACS). As células que se deslocam em uma fila única em uma corrente fina são passadas através de um feixe de laser, e a fluorescência de cada célula ligada pelo anticorpo anti-CLDN18.2 marcado de forma fluorescente é então medida.

[00165] A análise subsequente dos anticorpos anti-CLDN18.2 eluídos pode envolver o sequenciamento de proteína para delimitação das sequências de aminoácidos das cadeias leves e cadeias pesadas. Com base nas sequências de aminoácidos deduzidas, o cDNA que codifica os anticorpos anti-CLDN18.2 pode então ser obtido por métodos de clonagem recombinante que incluem PCR, avaliação de bibliotecas, pesquisas de homologia em bancos de dados de ácidos nucleicos existentes, ou qualquer combinação destes. Bancos de dados comumente empregados incluem, sem limitação, GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, SWISS-PROT, EST, STS, GSS e HTGS.

[00166] Quando uma biblioteca de anticorpos anti-CLDN18.2 é apresentada em fago ou partículas bacterianas, a seleção é preferivelmente realizada usando cromatografia por afinidade. O método tipicamente procede com ligação de uma biblioteca de anticorpos anti-CLDN18.2 em fago a placas revestidas com um antígeno, matrizes de coluna, células ou a um antígeno biotinilado em solução, seguida por captura. Os fagos ou bactérias ligadas à fase sólida são lavados e depois eluídos por hapteno, ácido ou álcali solúvel. Alternativamente, concentrações crescentes de antígeno podem ser usadas para dissociar os anticorpos anti-CLDN18.2 da matriz de afinidade. Para certos anticorpos anti-CLDN18.2

com afinidade ou avidéz extremamente alta ao antígeno, a eluição eficiente pode exigir pH alto ou solução redutora leve, como descrito em WO 92/01047.

[00167] A eficiência de seleção provavelmente depende de uma combinação de vários fatores, incluindo da cinética de dissociação durante a lavagem, e se múltiplos anticorpos anti-CLDN18.2 em um único fago ou bactéria podem se ligar simultaneamente aos antígenos em um suporte sólido. Por exemplo, anticorpos com cinética de dissociação rápida (e afinidades de ligação fracas) podem ser retidos por uso de lavagens curtas, exibição multivalente e uma densidade de revestimento de antígeno alta no suporte sólido. Inversamente, a seleção de anticorpos anti-CLDN18.2 com cinética de dissociação lenta (e boas afinidades de ligação) pode ser favorecida por uso de lavagens longas, fagos monovalentes e uma densidade de revestimento de antígeno baixa.

[00168] Quando desejado, a biblioteca de anticorpos anti-CLDN18.2 pode ser pré-selecionada contra um antígeno não relacionado para contra-selecionar os anticorpos indesejados. A biblioteca também pode ser pré-selecionada contra um antígeno relacionado a fim de isolar, por exemplo, anticorpos anti-idiotípicos.

### **Células hospedeiras**

[00169] Em algumas modalidades, a presente revelação fornece células hospedeiras que expressam qualquer um dos anticorpos anti-CLDN18.2 revelados nesse relatório descritivo. Uma célula hospedeira em questão tipicamente compreende um ácido nucleico que codifica qualquer um dos anticorpos anti-CLDN18.2 revelados nesse relatório

descritivo.

[00170] A invenção fornece células hospedeiras transfectadas com os polinucleotídeos, vetores, ou uma biblioteca dos vetores descritos acima. Os vetores podem ser introduzidos em uma célula procariótica ou eucariótica adequada por qualquer um de diversos meios apropriados, incluindo eletroporação, bombardeamento de microprojétil; lipofecção, infecção (em que o vetor é acoplado a um agente infeccioso), transfecção com o emprego de cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrana, ou outras substâncias. A escolha do meio para a introdução de vetores frequentemente dependerá das características da célula hospedeira.

[00171] Para a maioria das células animais, qualquer um dos métodos mencionados acima é adequado para liberação do vetor. Células animais preferidas são células de vertebrados, preferivelmente células de mamíferos, capazes de expressar produtos gênicos introduzidos exogenamente em grande quantidade, por exemplo, no nível de miligrama. Exemplos não limitantes de células preferidas são células NIH3T3, COS, HeLa, e células CHO.

[00172] Uma vez introduzidos em uma célula hospedeira adequada, a expressão dos anticorpos anti-CLDN18.2 pode ser determinada usando qualquer ensaio de ácido nucleico ou proteína conhecido na técnica. Por exemplo, a presença de mRNA transcrito de CDRs da cadeia leve ou CDRs da cadeia pesada, ou do anticorpo anti-CLDN18.2 pode ser detectada e/ou quantificada por ensaios de hibridização convencionais (por exemplo, análise *Northern blot*), procedimentos de amplificação (por exemplo, RT-PCR), SAGE (Patente U.S. N°

5.695.937), e tecnologias baseadas em arranjo (veja, por exemplo, as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.405.783, 5.412.087 e 5.445.934), usando sondas complementares a qualquer região de um polinucleotídeo que codifica o anticorpo anti-CLDN18.2.

[00173] A expressão do vetor também pode ser determinada por exame do anticorpo anti-CLDN18.2 expresso. Diversas metodologias estão disponíveis na técnica para análise de proteína. Elas incluem, sem limitação, radioimunoensaios, ELISA (ensaios imunorradiométricos ligado à enzima), imunoenaios em "sanduíche", ensaios imunorradiométricos, imunoenaios *in situ* (usando, por exemplo, ouro coloidal, marcadores de enzimas ou radioisótopo), análise *western blot*, ensaios de imunoprecipitação, ensaios imunofluorescentes e SDS-PAGE.

#### **Cargas úteis**

[00174] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo é ainda conjugado a uma carga útil. Em alguns casos, a carga útil é conjugada diretamente ao anticorpo anti-CLDN18.2. Em outros casos, a carga útil é conjugada indiretamente ao anticorpo anti-CLDN18.2 por meio de um ligante. Em alguns casos, a carga útil compreende uma pequena molécula, uma proteína ou fragmento funcional desta, um peptídeo ou um polímero de ácido nucleico.

[00175] Em alguns casos, o número de cargas úteis conjugadas ao anticorpo anti-CLDN18.2 (por exemplo, a proporção de fármaco-para-anticorpo ou DAR) é cerca de 1:1, uma carga útil para um anticorpo anti-CLDN18.2. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-

CLDN18.2 é cerca de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1 ou 20:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 2:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 3:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 4:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 6:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 8:1. Em alguns casos, a proporção das cargas úteis para o anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 12:1.

[00176] Em algumas modalidades, a carga útil é uma pequena molécula. Em alguns casos, a pequena molécula é uma carga útil citotóxica. Cargas úteis citotóxicas exemplares incluem, sem limitação, agentes de rompimento do microtúbulo, agentes modificadores de DNA ou inibidores de Akt.

[00177] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um agente de rompimento do microtúbulo. Agentes de rompimento do microtúbulo exemplares incluem, sem limitação, 2-metoxiestradiol, auristatina, chalconas, colchicina, combretastatina, criptoficina, dictiostatina, discodermolida, dolastatina, eleuterobina, epotilona, halicondrina, laulimalida, maitansina, noscapinóide, paclitaxel, pelorusida, fomopsina, podofilotoxina, rizoxina, espongistatina, taxano, tubulisina, alcalóide da vinca, vinorelbina, ou derivados ou análogos destes.

[00178] Em algumas modalidades, a tubulisina é um análogo ou derivado de tubulisina como descrito, por exemplo, nas

Patentes U.S. N<sup>os</sup> 8580820 e 8980833 e nas Publicações U.S. N<sup>os</sup> 20130217638, 20130224228 e 201400363454.

[00179] Em algumas modalidades, a maitansina é um maitansinóide. Em algumas modalidades, o maitansinóide é DM1, DM4 ou ansamitocina. Em algumas modalidades, o maitansinóide é DM1. Em algumas modalidades, o maitansinóide é DM4. Em algumas modalidades, o maitansinóide é ansamitocina. Em algumas modalidades, o maitansinóide é um derivado ou análogo de maitansinóide como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5208020, 5416064, 7276497, e 6716821 ou Publicações U.S. N<sup>os</sup> 2013029900 e US20130323268.

[00180] Em algumas modalidades, a carga útil é uma dolastatina, ou um derivado ou análogo desta. Em algumas modalidades, a dolastatina é dolastatina 10 ou dolastatina 15, ou derivados ou análogos destas. Em algumas modalidades, o análogo de dolastatina 10 é auristatina, soblidotina, simplostatina 1 ou simplostatina 3. Em algumas modalidades, o análogo de dolastatina 15 é cemadotina ou tasidotina.

[00181] Em algumas modalidades, o análogo de dolastatina 10 é auristatina ou um derivado de auristatina. Em algumas modalidades, a auristatina ou derivado de auristatina é auristatina E (AE), auristatina F (AF), éster de ácido auristatina E5-benzoilvalérico (AEVB), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF) ou monometil auristatina D (MMAD), auristatina PE ou auristatina PYE. Em algumas modalidades, o derivado de auristatina é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o derivado de auristatina é monometil auristatina F (MMAF). Em algumas modalidades, a auristatina é um derivado ou análogo de auristatina como descrito, por exemplo, na Patente U.S. N<sup>o</sup>

6884869, 7659241, 7498298, 7964566, 7750116, 8288352, 8703714 e 8871720.

[00182] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um agente modificador de DNA. Em algumas modalidades, o agente modificador de DNA compreende clivadores de DNA, intercaladores de DNA, inibidores da transcrição de DNA ou ligantes cruzados de DNA. Em alguns casos, o clivador de DNA compreende bleomicina A2, caliqueamicina ou derivados ou análogos destas. Em alguns casos, o intercalador de DNA compreende doxorubicina, epirubicina, PNU-159682, duocarmicina, pirrolobenzodiazepina, oligomicina C, daunorrubicina, valrubicina, topotecan, ou derivados ou análogos destes. Em alguns casos, o inibidor da transcrição de DNA compreende dactinomicina. Em alguns casos, o ligante cruzado de DNA compreende mitomicina C.

[00183] Em algumas modalidades, o agente modificador de DNA compreende amsacrina, antraciclina, camptotecina, doxorubicina, duocarmicina, enediina, etoposida, indolinobenzodiazepina, netropsina, teniposida, ou derivados ou análogos destas.

[00184] Em algumas modalidades, a antraciclina é doxorubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina, nemorrubicina, pixantrona, sabarrubicina ou valrubicina.

[00185] Em algumas modalidades, o análogo de camptotecina é topotecan, irinotecan, silatecan, cositecan, exatecan, lurtotecan, gimatecan, belotecan, rubitecan ou SN-38.

[00186] Em algumas modalidades, a duocarmicina é duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D,

duocarmicina SA ou CC-1065. Em algumas modalidades, a enediina é uma caliqueamicina, esperamicina ou dinemicina A.

[00187] Em algumas modalidades, a pirrolobenzodiazepina é antramicina, abbeimicina, chicamicina, DC-81, mazetramicina, neotramicinas A, neotramicina B, porotramicina, protracarcina, sibanomicina (DC-102), sibiromicina ou tomaimicina. Em algumas modalidades, a pirrolobenzodiazepina é um derivado de tomaimicina como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 8404678 e 8163736. Em algumas modalidades, a pirrolobenzodiazepina é como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 8426402, 8802667, 8809320, 6562806, 6608192, 7704924, 7067511, US7612062, 7244724, 7528126, 7049311, 8633185, 8501934, e 8697688 e U.S. Publicação N<sup>o</sup> US20140294868.

[00188] Em algumas modalidades, a pirrolobenzodiazepina é um dímero de pirrolobenzodiazepina. Em algumas modalidades, o dímero de PBD é um dímero simétrico. Exemplos de dímeros simétricos de PBD incluem, sem limitação, SJG-136 (SG-2000), ZC-423 (SG2285), SJG-720, SJG-738, ZC-207 (SG2202) e DSB-120 (Tabela 2). Em algumas modalidades, o dímero de PBD é um dímero assimétrico. Exemplos de dímeros assimétricos de PBD incluem, sem limitação, derivados de SJG-136 como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 8697688 e 9242013 e U.S. Publicação N<sup>o</sup> 20140286970.

[00189] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um inibidor de Akt. Em alguns casos, o inibidor de Akt compreende ipatasertib (GDC-0068) ou derivados deste.

[00190] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um inibidor de polimerase incluindo, sem limitação, inibidores de polimerase II como, por exemplo, a-amanitina

e inibidores poli(ADP-ribose) polimerase (PARP). Inibidores de PARP exemplares incluem, sem limitação, Iniparib (BSI 201), Talazoparib (BMN-673), Olaparib (AZD-2281), Olaparib, Rucaparib (AG014699, PF-01367338), Veliparib (ABT-888), CEP 9722, MK 4827, BGB-290 ou 3-aminobenzamida.

[00191] Em algumas modalidades, a carga útil compreende uma porção detectável. Porções detectáveis exemplares incluem corantes fluorescentes; enzimas; substratos; porções quimioluminescentes; porções de ligação específicas como, por exemplo, estreptavidina, avidina ou biotina; ou radioisótopos.

[00192] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um agente imunomodulador. Agentes imunomoduladores úteis incluem anti-hormônios que bloqueiam a ação do hormônio sobre tumores e agentes imunossupressores que suprimem a produção de citocina, infra-regulam a expressão de autoantígeno, ou mascaram antígenos MHC. Anti-hormônios representativos incluem antiestrogênios incluindo, por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazóis inibidores de aromatase, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY 117018, onapristona e toremifeno; e antiandrogênios como, por exemplo, flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelina; e agentes antiadrenais. Agentes imunossupressores ilustrativos incluem, sem limitação, pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-substituídas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldeído, anticorpos anti-idiotípicos para antígenos MHC e fragmentos de MHC, ciclosporina A, esteróides como, por exemplo, glicocorticosteróides, estreptoquinase ou rapamicina.

[00193] Em algumas modalidades, a carga útil compreende um imunorregulador. Imunorreguladores exemplares incluem, sem limitação, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato, glicocorticóide e seus análogos, xantinas, fatores de crescimento de célula-tronco, linfotoxinas, fatores hematopoiéticos, fator de necrose tumor (TNF) (por exemplo, TNF $\alpha$ ), interleucinas (por exemplo, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, e IL-21), fatores estimuladores de colônia (por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)), interferons (por exemplo, interferons-alfa, interferon-beta, interferon-gama), o fator de crescimento de célula-tronco designado "fator S1", eritropoietina e trombopoietina, ou uma combinação destes.

[00194] Em algumas modalidades, a carga útil compreende uma imunotoxina. Imunotoxinas incluem, sem limitação, ricina, radionuclídeos, proteína antiviral *pokeweed*, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, cadeia A de ricina, toxinas fúngicas como, por exemplo, restrictocina e enzimas fosfolipase. Veja, geralmente, "Chimeric Toxins", Olsnes e Pihl, *Pharmac. Ther.* 15: 355-381 (1981); e "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", eds. Baldwin e Byers, páginas 159-179, 224-266, Academic Press (1985).

[00195] Em alguns casos, a carga útil compreende um polímero de ácido nucleico. Nesses casos, o polímero de ácido nucleico compreende ácido nucleico interferente curto

(siNA), RNA interferente curto (siRNA), RNA de fita dupla (dsRNA), microRNA (miRNA), RNA *hairpin* curto (shRNA), um oligonucleotídeo anti-senso. Em outros casos, o polímero de ácido nucleico compreende um mRNA, que codifica, por exemplo, uma proteína ou peptídeo citotóxico ou uma proteína ou peptídeo que dispara apoptose. Proteínas ou peptídeos citotóxicos exemplares incluem uma citotoxina bacteriana como, por exemplo, uma toxina formadora de poro alfa (por exemplo, citolisina A de *E. coli*), uma toxina formadora de poro beta (por exemplo,  $\alpha$ -Hemolisina, leucocidina PVL-Panton Valentine, aerolisina, toxina Épsilon de clostrídio, enterotoxina de *Clostridium perfringens*), toxinas binárias (toxina do antraz, toxina de edema, toxina C2 de *C. botulinum*, toxina de *C. spiroforme*, toxina iota de *C. perfringens*, toxinas cito-letais de *C. difficile* (A e B)), príon, parasporina, citolisinas colesterol-dependentes (por exemplo, pneumolisina), uma toxina formadora de poro pequena (por exemplo, Gramicidina A), uma cianotoxina (por exemplo, microcistinas, nodularinas), uma hemotoxina, uma neurotoxina (por exemplo, neurotoxina botulínica), uma citotoxina, toxina colérica, toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina tetânica, ou uma imunotoxina (idarrubicina, ricina A, CRM9, proteína antiviral Pokeweed, DT). Proteínas ou peptídeos que disparam apoptose exemplares incluem fator de ativação de protease apoptótica-1 (Apaf-1), citocromo-c, proteínas iniciadoras de caspase (CASP2, CASP8, CASP9, CASP10), fator de indução de apoptose (AIF), p53, p73, p63, Bcl-2, Bax, granzima B, poli-ADP ribose polimerase (PARP), e quinase P 21-ativada 2 (PAK2). Em casos adicionais, o polímero de ácido nucleico compreende um ácido nucleico

*decoy*. Em alguns casos, o ácido nucleico *decoy* é um mimético de ácidos nucleicos de ligação à proteína como, por exemplo, miméticos de ligação à proteína baseados em RNA. Ácido nucleico *decoys* exemplares incluem região de transativação (TAR) *decoy* e elemento de resposta Rev (RRE) *decoy*.

[00196] Em alguns casos, a carga útil é um aptâmero. Aptâmeros são pequenas moléculas de oligonucleotídeo ou peptídeo que se ligam a moléculas-alvo específicas. Aptâmeros de ácido nucleico exemplares incluem aptâmeros de DNA, aptâmeros de RNA ou aptâmeros de XNA, que são aptâmeros de RNA e/ou DNA que compreendem um ou mais nucleotídeos não naturais. Aptâmeros de ácido nucleico exemplares incluem ARC19499 (Archemix Corp.), REG1 (Regado Biosciences) e ARC1905 (Ophthotech).

[00197] Ácidos nucleicos de acordo com as modalidades descritas nesse relatório descritivo opcionalmente incluem ácidos nucleicos de ocorrência natural, ou um ou mais análogos de nucleotídeos ou que possuem uma estrutura que, de outro modo, difere daquela de um ácido nucleico de ocorrência natural. Por exemplo, modificações-2' incluem grupos halo, alcóxi e aliloxi. Em algumas modalidades, o grupo 2'-OH é substituído por um grupo selecionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> ou CN, em que R é C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquil, alquenil ou alquinil, e halo é F, Cl, Br ou I. Exemplos de ligações modificadas incluem ligações fosforotioato e 5'-N-fosforamidita.

[00198] Ácidos nucleicos que possuem diversos análogos de nucleotídeos diferentes, arcabouços modificados ou ligações internucleosídeos de ocorrência não natural são utilizados de acordo com as modalidades descritas nesse

relatório descritivo. Em alguns casos, os ácidos nucleicos incluem nucleosídeos naturais (ou seja, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina e desoxicitidina) ou nucleosídeos modificados. Exemplos de nucleotídeos modificados incluem nucleosídeo de base modificada (por exemplo, azacitidina, inosina, isoguanosina, nebularina, pseudouridina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, 2-tiotimidina, 3-deaza-5-azacitidina, 2'-desoxiuridina, 3-nitorpirrol, 4-metilindol, 4-tiouridina, 4-tiotimidina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, 2-tiouridina, 5-bromocitidina, 5-iodouridina, inosina, 6-azauridina, 6-cloropurina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-azaadenosina, 8-azidoadenosina, benzimidazol, M1-metiladenosina, pirrolo-pirimidina, 2-amino-6-cloropurina, 3-metil adenosina, 5-propinilcitidina, 5-propiniluridina, 5-bromouridina, 5-fluoruridina, 5-metilcitidina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina e 2-tiocitidina), bases quimicamente ou biologicamente modificadas (por exemplo, bases metiladas), açúcares modificados (por exemplo, 2'-fluorribose, 2'-aminorribose, 2'-azidorribose, 2'-O-metilribose, nucleosídeos arabinose L-enantioméricos e hexose), grupos fosfato modificados (por exemplo, ligações fosforotioatos e 5'-N-fosforamidita), e combinações destes. Monômeros de nucleotídeos naturais e modificados para a síntese química de ácidos nucleicos são prontamente disponíveis. Em alguns casos, ácidos nucleicos que compreendem essas modificações exibem propriedades aprimoradas em relação aos ácidos nucleicos que consistem

apenas em nucleotídeos de ocorrência natural. Em algumas modalidades, as modificações de ácidos nucleicos descritas nesse relatório descritivo são utilizadas para reduzir e/ou evitar a digestão por nucleases (por exemplo, exonucleases, endonucleases etc.). Por exemplo, a estrutura de um ácido nucleico pode ser estabilizada por inclusão de análogos de nucleotídeos na extremidade 3' de uma ou ambas as fitas a fim de reduzir a digestão.

[00199] Diferentes modificações de nucleotídeos e/ou estruturas de arcabouço podem existir em várias posições no ácido nucleico. Essas modificações incluem morfolinos, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), metilfosfonato nucleotídeos, tiol-fosfonato nucleotídeos, 2'-flúor N3-P5'-fosforamiditas, ácidos nucleicos 1',5'-anidrohexitol (HNAs), ou uma combinação destes.

#### **Química de conjugação**

[00200] Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo por uma ligação nativa. Em alguns casos, a conjugação é como descrita em: Dawson, e cols. "Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation", *Science* 1994, 266, 776-779; Dawson, e cols. "Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation Through the Use of Thiol Additives", *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4.325-4.329; Hackeng, e cols. "Protein Synthesis by Native Chemical Ligation: Expanded Scope by Using Straightforward Methodology", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 10.068-10.073; ou Wu, e cols. "Building Complex Glycopeptides: Development of a Cystein-Free Native Chemical Ligation Protocol", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 4.116-4.125. Em alguns casos, a conjugação é como descrita na

Patente U.S. N° 8.936.910.

[00201] Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo por um método sítio-dirigido que utiliza uma tecnologia de acoplamento "sem rastros" (*traceless*) (Philochem). Em alguns casos, a tecnologia de acoplamento "sem rastros" utiliza um grupo 1,2-aminotiol do terminal-N na porção de ligação que é então conjugado com uma molécula de ácido polinucleico que contém um grupo aldeído (veja *Casi e cols.*, "Site-Specific Traceless Coupling of Potent Cytotoxic Drugs to Recombinant Antibodies for Pharmacodelivery", *JACS* **134** (13): 5.887-5.892 (2012)).

[00202] Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo por um método sítio-dirigido que utiliza um aminoácido não natural incorporado na porção de ligação. Em alguns casos, o aminoácido não natural compreende *p*-acetilfenilalanina (pAcPhe). Em alguns casos, o grupo ceto de pAcPhe é acoplado seletivamente a uma porção de conjugação alcóxi-amina derivatizada para formar uma ligação oxima (veja *Axup e cols.*, "Synthesis of Site-Specific Antibody-Drugs Conjugates Using Unnatural Amino Acids", *PNAS* **109** (40): 16.101-16.106 (2012)).

[00203] Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo por um método sítio-dirigido que utiliza um processo catalisado por enzima. Em alguns casos, O método sítio-dirigido utiliza tecnologia SMARTag™ (Redwood). Em alguns casos, a tecnologia SMARTag™ compreende a geração de um resíduo formilglicina (FGly) de cisteína pela enzima de

geração de formilglicina (FGE) por meio de um processo de oxidação sob a presença de um *tag* de aldeído e a conjugação subsequente de FGly a uma molécula de ácido polinucleico alquil-hidrazina-funcionalizada por meio de uma ligação hidrazino-Pictet-Spengler (HIPS). (veja Wu e cols., "Site-Specific Chemical Modification of Recombinant Proteins Produced in Mammalian Cells by Using the Genetically Encoded Aldehyde tag", *PNAS* **106** (9): 3.000-3.005 (2009); Agarwal, e cols., "A Pictet-Spengler Ligation for Protein Chemical Modification", *PNAS* **110** (1): 46-51 (2013)).

[00204] Em alguns casos, o processo catalisado por enzima compreende transglutaminase microbiana (mTG). Em alguns casos, a carga útil é conjugada ao anticorpo anti-CLDN18.2 que utilizando um processo catalisado por transglutaminase microbiana. Em alguns casos, mTG catalisa a formação de uma ligação covalente entre a cadeia lateral amida de uma glutamina dentro da sequência de reconhecimento e uma amina primária de uma molécula de ácido polinucleico funcionalizada. Em alguns casos, mTG é produzida por *Streptomyces mobarensis* (veja Strop e cols., "Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates", *Chemistry and Biology* **20** (2) 161-167 (2013)).

[00205] Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um anticorpo anti-CD38, um anticorpo anti-ICAM1 ou um anticorpo multiespecífico (por exemplo, um anticorpo anti-CD38/ICAM1 biespecífico) descrito nesse relatório descritivo por um método como descrito na Publicação PCT N° WO 2014/140317, que utiliza uma transpeptidase sequência-específica.

**[00206]** Em alguns casos, a carga útil é conjugada a um

anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo por um método como descrito nas Publicações de Patentes U.S. N<sup>os</sup> 2015/0105539 e 2015/0105540.

### **Ligante**

[00207] Em alguns casos, um ligante descrito acima compreende um polímero natural ou sintético, que consiste em cadeias longas de monômeros ramificados ou não ramificados, e/ou uma rede reticulada de monômeros em duas ou três dimensões. Em alguns casos, o ligante inclui um polissacarídeo, lignina, borracha ou óxido de polialquileno (por exemplo, polietileno glicol).

[00208] Em alguns casos, o ligante inclui, sem limitação, alfa-, ômega-diidroxil-polietilenoglicol, polímero biodegradável à base de lactona, por exemplo, ácido poliacrílico, ácido polilactídeo (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), polipropileno, poliestireno, poliolefina, poliamida, policianoacrilato, poliimida, polietileno-tereftalato (PET, PETG), tereftalato de polietileno (PETE), politetrametileno glicol (PTG) ou poliuretano, bem como misturas destes. Como usado nesse relatório descritivo, o termo "mistura" se refere ao uso de polímeros diferentes dentro do mesmo composto, bem como em referência aos copolímeros em bloco. Em alguns casos, copolímeros em bloco são polímeros nos quais pelo menos uma seção de um polímero é constituída por monômeros de outro polímero. Em alguns casos, o ligante compreende óxido de polialquileno. Em alguns casos, o ligante compreende PEG. Em alguns casos, o ligante compreende polietileno imida (PEI) ou hidroxí etil amido (HES).

[00209] Em alguns casos, o óxido de polialquileno (por

exemplo, PEG) é um composto polidisperso ou monodisperso. Em alguns casos, material polidisperso compreende uma distribuição dispersa de peso molecular diferente do material, caracterizado por tamanho e dispersibilidade do peso médio (peso médio). Em alguns casos, o PEG monodisperso compreende um tamanho de moléculas. Em algumas modalidades, o ligante é óxido de polialquileno poli- ou monodisperso (por exemplo, PEG) e o peso molecular indicado representa uma média do peso molecular das moléculas de óxido de polialquileno, por exemplo, PEG, .

[00210] Em algumas modalidades, o ligante compreende um óxido de polialquileno (por exemplo, PEG) e o peso molecular do óxido de polialquileno (por exemplo, PEG) é cerca de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3250, 3350, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4600, 4750, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10.000, 12.000, 20.000, 35.000, 40.000, 50.000, 60.000 ou 100.000 Da.

[00211] Em algumas modalidades, o óxido de polialquileno (por exemplo, PEG) é um PEG distinto, em que o PEG distinto é um PEG polimérico que compreende mais de uma unidade repetitiva de óxido de etileno. Em alguns casos, um PEG distinto (dPEG) compreende de 2 a 60, de 2 a 50, ou de 2 a 48 unidades repetitivas de óxido de etileno. Em alguns casos, um dPEG compreende cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 42, 48, 50 ou mais unidades repetitivas de óxido de etileno. Em alguns casos, um dPEG compreende cerca de 2 ou mais unidades repetitivas de óxido de etileno. Em alguns

casos, um dPEG é sintetizado como um composto de peso molecular único a partir de material de partida puro (por exemplo, cerca de 95%, 98%, 99% ou 99,5%) em etapas. Em alguns casos, um dPEG possui um peso molecular específico, ao invés de um peso molecular médio. Em alguns casos, um dPEG descrito nesse relatório descritivo é um dPEG de Quanta Biodesign, LMD.

[00212] Em alguns casos, o ligante é um PEG distinto, que opcionalmente compreende de 2 a 60, de 2 a 50, ou de 2 a 48 unidades repetitivas de óxido de etileno. Em alguns casos, o ligante compreende um dPEG que compreende cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 42, 48, 50 ou mais unidades repetitivas de óxido de etileno. Em alguns casos, o ligante é um dPEG de Quanta Biodesign, LMD.

[00213] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante polipeptídico. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, ou mais resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende no máximo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou menos resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, o ligante polipeptídico é um ligante polipeptídico clivável (por exemplo, enzimaticamente ou quimicamente). Em alguns casos, o ligante polipeptídico é um ligante polipeptídico não clivável. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende Val-Cit (valina-citrulina), Gly-Gly-Phe-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Gly-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Arg, Phe-Cit, Phe-Arg,

Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu ou Gly-Phe-Leu-Gly. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende um peptídeo como, por exemplo: Val-Cit (valina-citrulina), Gly-Gly-Phe-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Gly-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Arg, Phe-Cit, Phe-Arg, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu, ou Gly-Phe-Leu-Gly. Em alguns casos, o ligante polipeptídico compreende L-aminoácidos, D-aminoácidos, ou uma mistura de aminoácidos tanto L quanto D.

[00214] Em alguns casos, o ligante compreende um ligante homobifuncional. Ligantes homobifuncionais incluem, sem limitação, reagente ditiobis de Lomant (succinimidilpropionato) DSP, 3'3'-ditiobis(sulfossuccinimidil propionato) (DTSSP), disuccinimidil suberato (DSS), bis(sulfossuccinimidil)suberato (BS), disuccinimidil tartrato (DST), dissulfossuccinimidil tartrato (sulfo DST), etileno glicobis(succinimidilsuccinato) (EGS), disuccinimidil glutarato (DSG), N,N'-disuccinimidil carbonato (DSC), dimetil adipimidato (DMA), dimetil pimelimidato (DMP), dimetil suberimidato (DMS), dimetil-3,3'-ditiobispropionimidato (DTBP), 1,4-di-3'-(2'-piridilditio)propionamido)butano (DPDPB), bismaleimidohexano (BMH), composto que contém haleto de arila (DFDNB) como, por exemplo, 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno ou 1,3-diflúor-4,6-dinitrobenzeno, 4,4'-diflúor-3,3'-dinitrofenilsulfona (DFDNPS), bis-[ $\beta$ -(4-azidossalicilamido)etil]dissulfeto (BASED), formaldeído, glutaraldeído, 1,4-butanodiol diglicidil éter, diidrazida de ácido adípico, carbohidrazida, o-toluidina, 3,3'-

dimetilbenzidina, benzidina,  $\alpha, \alpha'$ -p-diaminodifenil, ácido diiodo-p-xileno sulfônico, N,N'-etileno-bis(iodoacetamida), ou N,N'-hexametileno-bis(iodoacetamida).

[00215] Em algumas modalidades, o ligante compreende um ligante heterobifuncional. Ligantes heterobifuncionais exemplares incluem, sem limitação, ligantes cruzados reativos à amina e de sulfidrila como, por exemplo, N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato de cadeia longa (LC-sPDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato de cadeia longa hidrossolúvel (sulfo-LC-sPDP), succinimidiloxicarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)tolueno (sMPT), sulfossuccinimidil-6-[ $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridilditio)toluamido]hexanoato (sulfo-LC-sMPT), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sMCC), sulfossuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-sMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida (MBs), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissulfossuccinimida (sulfo-MBs), N-succinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (sIAB), sulfossuccinimidil(4-iodoacetil)aminobenzoato (sulfo-sIAB), succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sMPB), sulfossuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-sMPB), éster de N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)succinimida (GMBs), éster de N-( $\gamma$ -maleimidobutiriloxi)sulfossuccinimida (sulfo-GMBs), succinimidil 6-((iodoacetil)amino)hexanoato (sIAX), succinimidil 6-[6-((iodoacetil)amino)hexanoil)amino]hexanoato (sIAXX), succinimidil 4-(((iodoacetil)amino)metil)ciclohexano-1-carboxilato (sIAC), succinimidil 6-(((4-

iodoacetil) amino) metil) ciclohexano-1-carbonil) amino) hexanoato (sIACX), p-nitrofenil iodoacetato (NPIA), ligantes cruzados reativos à carbonila e reativos à sulfidrilas como, por exemplo, hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico (MPBH), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida-8 (M<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H), 3-(2-piridilditio)propionil hidrazida (PDPH), ligantes cruzados reativos à amina e fotorreativos como, por exemplo, ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidossalicílico (NHs-AsA), ácido N-hidroxisulfossuccinimidil-4-azidossalicílico (sulfo-NHs-AsA), sulfossuccinimidil-(4-azidossalicilamido)hexanoato (sulfo-NHs-LC-AsA), sulfossuccinimidil-2-(p-azidossalicilamido)etil-1,3'-ditiopropionato (sAsD), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HsAB), N-hidroxisulfossuccinimidil-4-azidobenzoato (sulfo-HsAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sANPAH), sulfossuccinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (sulfo-sANPAH), N-5-azido-2-nitrobenzoiloxissuccinimida (ANB-NOs), sulfossuccinimidil-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-etil-1,3'-ditiopropionato (sAND), N-succinimidil-4(4-azidofenil)1,3'-ditiopropionato (sADP), N-sulfossuccinimidil(4-azidofenil)-1,3'-ditiopropionato (sulfo-sADP), sulfossuccinimidil 4-(p-azidofenil)butirato (sulfo-sAPB), sulfossuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcumarin-3-acetamida)etil-1,3'-ditiopropionato (sAED), sulfossuccinimidil 7-azido-4-metilcumarin-3-acetato (sulfo-sAMCA), p-nitrofenil diazopiruvato (pNPDP), p-nitrofenil-2-diazo-3,3,3-trifluorpropionato (PNP-DTP), ligantes cruzados reativos à sulfidrilas e fotorreativos como, por exemplo, 1-(p-Azidossalicilamido)-4-

(iodoacetamido)butano (AsIB), N-[4-( $\rho$ -azidossalicilamido)butil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (APDP), benzofenona-4-iodoacetamida, ligantes cruzados reativos à benzofenona-4-maleimida carbonila e fotorreativos como, por exemplo,  $\rho$ -azidobenzoil hidrazida (ABH), ligantes cruzados reativos ao carboxilato e fotorreativos como, por exemplo, 4-( $\rho$ -azidossalicilamido)butilamina (AsBA) e ligantes cruzados reativos à arginina e fotorreativos como, por exemplo,  $\rho$ -azidofenil glioxal (APG).

[00216] Em algumas modalidades, o ligante compreende um grupo ácido benzóico, ou seus derivados. Em alguns casos, o grupo ácido benzóico ou seus derivados compreendem ácido para-aminobenzóico (PABA). Em alguns casos, o grupo ácido benzóico ou seus derivados compreendem ácido gama-aminobutírico (GABA).

[00217] Em algumas modalidades, o ligante compreende um ou mais de um grupo maleimida, uma porção peptídica e/ou um grupo ácido benzóico, em qualquer combinação. Em algumas modalidades, o ligante compreende uma combinação de um grupo maleimida, uma porção peptídica e/ou um grupo ácido benzóico. Em alguns casos, o grupo maleimida é maleimidocaproil (mc). Em alguns casos, o grupo peptídico é val-cit. Em alguns casos, o grupo ácido benzóico é PABA. Em alguns casos, o ligante compreende um grupo mc-val-cit. Em alguns casos, o ligante compreende um grupo val-cit-PABA. Em casos adicionais, o ligante compreende um grupo mc-val-cit-PABA.

[00218] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante autoimolativo ou um ligante de autoeliminação. Em alguns casos, o ligante é um ligante autoimolativo. Em outros casos, o ligante é um ligante de autoeliminação (por exemplo, um

ligante de ciclização de autoeliminação). Em alguns casos, o ligante compreende um ligante descrito na Patente U.S. N° 9.089.614 ou na Publicação PCT N° WO 2015038426.

[00219] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante do tipo dendrítico. Em alguns casos, o ligante do tipo dendrítico compreende uma porção ligante multifuncional, de ramificação. Em alguns casos, o ligante do tipo dendrítico compreende dendrímeros de PAMAM.

[00220] Em algumas modalidades, o ligante é um ligante sem rastros ou um ligante no qual, após clivagem, não abandona uma porção de ligação (por exemplo, um átomo ou um grupo ligante) ao anticorpo ou carga útil. Ligantes sem rastros exemplares incluem, sem limitação, ligantes de germânio, ligantes de silício, ligantes de enxofre, ligantes de selênio, ligantes de nitrogênio, ligantes de fósforo, ligantes de boro, ligantes de cromo ou ligantes de fenil-hidrazida. Em alguns casos, o ligante é um ligante sem rastros de aril-triazeno como descrito em Hejesen, *e cols.*, "A Traceless Aryl-Triazene Linker for DNA-Directed Chemistry", *Org. Biomol. Chem.* **11** (15): 2.493-2.497 (2013). Em alguns casos, o ligante é um ligante sem rastros descrito em Blaney, *e cols.*, "Traceless Solid Phase Organic Synthesis", *Chem. Rev.* **102**: 2.607-2.024 (2002). Em alguns casos, um ligante é um ligante sem rastros como descrito na Patente U.S. N° 6.821.783.

#### **Métodos de uso**

[00221] Em certas modalidades, é revelado nesse relatório descritivo um método de tratamento de um indivíduo que possui um câncer que é caracterizado por uma superexpressão de proteína CLDN18.2. Em alguns casos, o método compreende a

administração ao indivíduo de um anticorpo anti-CLDN18.2 descrito nesse relatório descritivo ou de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CLDN18.2 para tratar o câncer no indivíduo. Em alguns casos, o câncer é um câncer gastrointestinal. Cânceres gastrointestinais exemplares incluem cânceres do esôfago, vesícula biliar e trato biliar, fígado, pâncreas, estômago, intestino delgado, intestino grosso, cólon, reto e/ou ânus.

[00222] Em alguns casos, o câncer gastrointestinal é câncer do estômago (ou gástrico). Em alguns casos, o câncer do estômago (ou gástrico) compreende adenocarcinomas do estômago, linfoma gástrico, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor carcinóide, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula pequena ou leiomiossarcoma.

[00223] Em alguns casos, o câncer gastrointestinal é câncer pancreático. Em alguns casos, o câncer pancreático compreende um tumor exócrino como, por exemplo, adenocarcinoma do pâncreas, carcinoma de célula acinar, neoplasia intraductal papilar-mucinoso (IPMN) ou cistadenocarcinoma mucinoso; ou um tumor neuroendócrino pancreático (PNET) (também conhecido como tumor da célula da ilhota), por exemplo, gastrinoma, glucagonoma, insulinoma, somatostatina, VIPoma ou tumor da célula da ilhota não funcional.

[00224] Em alguns casos, o câncer gastrointestinal é câncer esofágico. Em alguns casos, o câncer esofágico compreende adenocarcinoma do esôfago, carcinoma de célula escamosa ou carcinoma de célula pequena.

[00225] Em alguns casos, o câncer gastrointestinal é colangiocarcinoma.

[00226] Em alguns casos, o câncer é câncer de pulmão. Em alguns casos, o câncer de pulmão compreende um câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), por exemplo, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma de célula escamosa ou carcinoma de célula grande; ou câncer de pulmão de célula pequena (SCLC).

[00227] Em alguns casos, o câncer é câncer ovariano. Em alguns casos, o câncer ovariano compreende um tumor ovariano epitelial, um tumor ovariano de célula germinativa, um tumor estromal ovariano ou um carcinoma peritoneal primário.

[00228] Em algumas modalidades, o método ainda compreende a administração ao indivíduo de um agente terapêutico adicional. Em alguns casos, o agente terapêutico adicional compreende um agente quimioterápico, um agente imunoterápico, um agente terapêutico direcionado, um agente terapêutico à base de hormônio ou um agente terapêutico à base de célula-tronco.

[00229] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional compreende um agente quimioterápico. Agentes quimioterápicos exemplares incluem, sem limitação, agentes alquilantes como, por exemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, clorambucil, melfalan, dacarbazina ou nitrosouréias; antraciclinas como, por exemplo, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona ou valrubicina; disruptores citoesqueléticos como, por exemplo, paclitaxel, docetaxel, Abraxane ou taxotere; eptilonas; inibidores de histona desacetilase como, por exemplo, vorinostat ou romidepsina; inibidores de topoisomerase I como, por exemplo, irinotecan ou topotecan; inibidores da topoisomerase II como, por exemplo, etoposida, teniposida, ou tafluposida; inibidores

de quinase como, por exemplo, bortezomib, erlotinib, gefitinib, imatinib, vemurafenib ou vismodegib; análogos de nucleotídeos e análogos precursores como, por exemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluoruracil, gemcitabina, hidroxiuréia, mercaptopurina, metotrexato ou tioguanina; agentes à base de platina como, por exemplo, carboplatina, cisplatina ou oxaliplatina; retinóides como, por exemplo, tretinoína, alitretinoína ou bexaroteno; ou alcalóides da vinca e derivados como, por exemplo, vinblastina, vincristina, vindesina ou vinorelbina.

[00230] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional compreende um agente imunoterápico. Em alguns casos, a imunoterapia é uma terapia adotiva de células. terapias adotivas de células exemplares incluem AFP TCR, MAGE-A10 TCR ou NY-ESO-TCR de Adaptimmune; ACTR087/rituximab de Unum Therapeutics; terapia de célula CAR-T anti-BCMA, terapia de célula CAR-T "blindada" anti-CD19, JCAR014, JCAR018, JCAR020, JCAR023, JCAR024 ou JTCR016 de Juno Therapeutics; JCAR017 de Celgene/Juno Therapeutics; terapia de célula CAR-T anti-CD19 de Intrexon; terapia de célula CAR-T anti-CD19, axicabtagene ciloleucel, KITE-718, KITE-439 ou terapia de receptor de célula T NY-ESO-1 de Kite Pharma; terapia com CAR-T anti-CEA de Sorrento Therapeutics; terapia de célula CAR-T anti-PSMA de TNK Therapeutics/Sorrento Therapeutics; ATA520 de Atara Biotherapeutics; AU101 e AU105 de Aurora BioPharma; baltaleucel-T (CMD-003) de Cell Medica; bb2121 de Bluebird Bio; BPX-501, BPX-601 ou BPX-701 de Bellicum Pharmaceuticals; BSK01 de Kiromic; IMCgp100 de Immunocore; JTX-2011 de Jounce Therapeutics; LN-144 ou LN-145 de Lion

Biotechnologies; MB-101 ou MB-102 de Mustang Bio; NKR-2 de Celyad; PNK-007 de Celgene; Tisagenlecleucel-T de Novartis Pharmaceuticals; ou TT12 de Tessa Therapeutics.

[00231] Em alguns casos, a imunoterapia é uma terapia à base de célula dendrítica.

[00232] Em alguns casos, a imunoterapia compreende uma terapia à base de citocina, que compreende, por exemplo, uma interleucina (IL), por exemplo, IL-2, IL-15, ou IL-21, interferon (IFN)- $\alpha$ , ou fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF).

[00233] Em alguns casos, a imunoterapia compreende um modulador do ponto de verificação imune. Moduladores do ponto de verificação imune exemplares incluem moduladores de PD-1 como, por exemplo, nivolumab (Opdivo) de Bristol-Myers Squibb, pembrolizumab (Keytruda) de Merck, AGEN 2034 de Agenus, BGB-A317 de BeiGene, BI-754091 de Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, CBT-501 (genolimzumab) de CBT Pharmaceuticals, INCSHR1210 de Incyte, JNJ-63723283 de Janssen Research & Development, MEDI0680 de MedImmune, MGA 012 de MacroGenics, PDR001 de Novartis Pharmaceuticals, PF-06801591 de Pfizer, REGN2810 (SAR439684) de Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi ou TSR-042 de TESARO; moduladores de CTLA-4 como, por exemplo, ipilimumab (Yervoy) ou AGEN 1884 de Agenus; moduladores de PD-L1 como, por exemplo, durvalumab (Imfinzi) de AstraZeneca, atezolizumab (MPDL3280A) de Genentech, avelumab de EMD Serono/Pfizer, CX-072 de CytomX Therapeutics, FAZ053 de Novartis Pharmaceuticals, KN035 de 3D Medicine/Alphamab, LY3300054 de Eli Lilly ou M7824 (anti-PD-L1/TGF $\beta$  trap) de EMD Serono; moduladores de LAG3 como, por exemplo, BMS-986016 de Bristol-Myers Squibb, IMP701 de

Novartis Pharmaceuticals, LAG525 de Novartis Pharmaceuticals ou REGN3767 de Regeneron Pharmaceuticals; moduladores de OX40 como, por exemplo, BMS-986178 de Bristol-Myers Squibb, GSK3174998 de GlaxoSmithKline, INCAGN1949 de Agenus/Incyte, MEDI0562 de MedImmune, PF-04518600 de Pfizer ou RG7888 de Genentechp; moduladores de GTR como, por exemplo, GWN323 de Novartis Pharmaceuticals, INCAGN1876 de Agenus/Incyte, MEDI1873 de MedImmune, MK-4166 de Merck ou TRX518 de Leap Therapeutics; moduladores de KIR como, por exemplo, lirilumab de Bristol-Myers Squibb; ou moduladores de TIM como, por exemplo, MBG453 de Novartis Pharmaceuticals ou TSR-022 de Tesaro.

[00234] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional compreende um agente terapêutico à base de hormônio. Agentes terapêuticos à base de hormônio exemplares incluem, sem limitação, inibidores de aromatase como, por exemplo, letrozol, anastrozol, exemestano ou aminoglutetimida; análogos do hormônio de liberação de gonadotrofina (GnRH) como, por exemplo, leuprorelina ou goserelina; moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), por exemplo, tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno ou fulvestrant; antiandrogênicos como, por exemplo, flutamida ou bicalutamida; progestágenos como, por exemplo, acetato de megestrol ou acetato de medroxiprogesterona; androgênicos como, por exemplo, fluoximesterona; estrogênicos como, por exemplo, estrogênio dietilestilbestrol (DES), Estrace ou fosfato de poliestradiol; ou análogos de somatostatina como, por exemplo, octreotida.

[00235] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional é um agente terapêutico de primeira linha.

[00236] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CLDN18.2 e o agente terapêutico adicional são administrados simultaneamente.

[00237] Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 e o agente terapêutico adicional são administrados sequencialmente. Nesses casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é administrado ao indivíduo antes da administração do agente terapêutico adicional. Em outros casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 é administrado ao indivíduo após o agente terapêutico adicional ser administrado.

[00238] Em alguns casos, o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são formulados como dosagens separadas.

[00239] Em alguns casos, o indivíduo foi submetido à cirurgia. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 e, opcionalmente, o agente terapêutico adicional são administrados ao indivíduo após cirurgia. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 e, opcionalmente, o agente terapêutico adicional são administrados ao indivíduo antes de cirurgia.

[00240] Em alguns casos, o indivíduo foi submetido à radiação. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 e, opcionalmente, o agente terapêutico adicional são administrados ao indivíduo durante ou após radioterapia. Em alguns casos, o anticorpo anti-CLDN18.2 e, opcionalmente, o agente terapêutico adicional são administrados ao indivíduo antes de radioterapia.

[00241] Em alguns casos, o indivíduo é um humano.

[00242] Em algumas modalidades, também é descrito nesse relatório descritivo um método de indução de efeito de morte

celular. Em alguns casos, o método compreende o contato de diversas células com um anticorpo anti-CLDN18.2 que compreende uma carga útil por um tempo suficiente para internalizar o anticorpo anti-CLDN18.2 para induzir o efeito de morte celular. Em alguns casos, a carga útil compreende um maitansinóide, uma auristatina, um taxóide, uma caliqueamicina, uma duocarmicina, uma amatoxina ou um derivado destes. Em alguns casos, a carga útil compreende uma auristatina ou um derivado desta. Em alguns casos, a carga útil é monometil auristatina E (MMAE). Em alguns casos, a carga útil é monometil auristatina F (MMAF).

[00243] Em alguns casos, a célula é uma célula de câncer. Em alguns casos, a célula é de um câncer gastrintestinal. Em alguns casos, o câncer gastrintestinal é um câncer gástrico. Em alguns casos, o câncer gastrintestinal é um câncer pancreático. Em alguns casos, o câncer gastrintestinal é um câncer esofágico ou colangiocarcinoma. Em alguns casos, a célula é de um câncer de pulmão ou um câncer ovariano.

[00244] Em algumas modalidades, o método é um método *in vitro*.

[00245] Em algumas modalidades, o método é um método *in vivo*.

#### **Composições farmacêuticas**

[00246] Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CLDN18.2 é ainda formulado como uma composição farmacêutica. Em alguns casos, a composição farmacêutica é formulada para administração a um indivíduo por diversas vias de administração incluindo, sem limitação, a via de administração parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intra-arterial, intradérmica,

intraperitoneal, intravítrea, intracerebral ou intracerebroventricular), oral, intranasal, bucal, retal ou transdérmica. Em alguns casos, a composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo é formulada para administração parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intra-arterial, intradérmica, intraperitoneal, intravítrea, intracerebral ou intracerebroventricular). Em outros casos, a composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo é formulada para administração oral. Ainda em outros casos, a composição farmacêutica descrita nesse relatório descritivo é formulada para administração intranasal.

[00247] Em algumas modalidades, as formulações farmacêuticas incluem, sem limitação, dispersões líquidas aquosas, dispersões autoemulsificante, soluções sólidas, dispersões lipossomais, aerossóis, formas de dosagem sólidas, pós, formulações de liberação imediata, formulações de liberação controlada, formulações de derretimento rápido, comprimidos, capsules, pílulas, formulações de liberação retardada, formulações de liberação estendida, formulações de liberação pulsátil, formulações multiparticuladas (por exemplo, formulações de nanopartículas) e formulações mistas de liberação imediata e controlada.

[00248] Em alguns casos, a formulação farmacêutica inclui formulações multiparticuladas. Em alguns casos, a formulação farmacêutica inclui formulações de nanopartículas. Nanopartículas exemplares incluem, sem limitação, nanopartículas paramagnéticas, nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de metal, materiais do tipo fulereno, nanotubos inorgânicos, dendrímeros (por

exemplo, com quelatos de metal anexados covalentemente), nanofibras, *nanohorns*, *nano-onions*, nanobastões, *nanoropes* e pontos quânticos. Em alguns casos, uma nanopartícula é uma nanopartícula de metal, por exemplo, uma nanopartícula de escândio, titânio, vanádio, cromo, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco, ítrio, zircônio, nióbio, molibdênio, rutênio, ródio, paládio, prata, cádmio, háfnio, tântalo, tungstênio, rênio, ósmio, irídio, platina, ouro, gadolínio, alumínio, gálio, índio, estanho, tálio, chumbo, bismuto, magnésio, cálcio, estrôncio, bário, lítio, sódio, potássio, boro, silício, fósforo, germânio, arsênico, antimônio e combinações, ligas ou óxidos destes.

[00249] Em alguns casos, uma nanopartícula inclui um núcleo ou um centro e uma casca, como em uma nanopartícula núcleo-casca. Em alguns casos, uma nanopartícula possui pelo menos uma dimensão de menos do que cerca de 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm ou 100 nm.

[00250] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas incluem um carreador ou materiais carreadores selecionados com base na compatibilidade com a composição revelada nesse relatório descritivo, e as propriedades do perfil de liberação da forma de dosagem desejada. Carreador materiais exemplares incluem, por exemplo, ligantes, agentes de suspensão, agentes desintegrantes, agentes de enchimento, tensoativos, solubilizantes, estabilizantes, lubrificantes, agentes umidificantes, diluentes e semelhantes. Materiais carreadores farmacêuticamente compatíveis incluem, sem limitação, acácia, gelatina, dióxido de silício coloidal, glicerofosfato de cálcio, lactato de cálcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnésio, polivinilpirrolidona (PVP),

colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sódio, lecitina de soja, ácido taurocólico, fosfatidilcolina, cloreto de sódio, trifosfato de cálcio, fosfato dipotássico, celulose e conjugados de celulose, açúcares de estearoil lactilato de sódio, carragenana, monoglicerídeo, diglicerídeo, amido pré-gelatinizado e semelhantes. Veja, por exemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19ª Edição (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. e Lachman, L., Eds., "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Decker, Nova York, N.Y., 1980; e "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª Edição (Lippincott Williams & Wilkins, 1999).

[00251] Em alguns casos, as composições farmacêuticas ainda incluem agentes de ajuste do pH ou agentes de tamponamento que incluem ácidos como, por exemplo, ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico e clorídrico; bases como, por exemplo, hidróxido de sódio, fosfato de sódio, borato de sódio, citrato de sódio, acetato de sódio, lactato de sódio e tris-hidroximetilaminometano; e tampões como, por exemplo, citrato/dextrose, bicarbonato de sódio e cloreto de amônio. Esses ácidos, bases e tampões estão incluídos em uma quantidade necessária para manter o pH da composição em uma faixa aceitável.

[00252] Em alguns casos, as composições farmacêuticas incluem um ou mais sais em uma quantidade necessária para levar a osmolalidade da composição até uma faixa aceitável. Esses sais incluem aqueles que possuem cátions de sódio, potássio ou amônio e ânions de cloreto, citrato, ascorbato,

borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato ou bissulfito; sais adequados incluem cloreto de sódio, cloreto de potássio, tiosulfato de sódio, bissulfito de sódio e sulfato de amônio.

[00253] Em alguns casos, as composições farmacêuticas ainda incluem diluente que são usados para estabilizar compostos, pois podem fornecer um ambiente mais estável. Sais dissolvidos em soluções tamponadas (que também podem fornecer controle ou manutenção de pH) são utilizados como diluentes na técnica incluindo, sem limitação, uma solução salina tamponada com fosfato. Em certos casos, os diluentes aumentam o volume da composição para facilitar a compressão ou criar volume suficiente para misturação homogênea para enchimento da cápsula. Esses compostos podem incluir, por exemplo, lactose, amido, manitol, sorbitol, dextrose, celulose microcristalina como, por exemplo, Avicel®; fosfato de cálcio dibásico, diidrato de difosfato de cálcio; trifosfato de cálcio, fosfato de cálcio; lactose anidra, lactose liofilizada; amido pré-gelatinizado, açúcar compressível como, por exemplo, Di-Pac® (Amstar); manitol, hidroxipropilmetilcelulose, estearato de acetato de hidroxipropilmetilcelulose, diluentes à base de sacarose, açúcar de confeitiro; monidrato de sulfato de cálcio monobásico, diidrato de sulfato de cálcio; triidrato de lactato de cálcio, dextratos; sólidos de cereal hidrolisado, amilose; celulose em pó, carbonato de cálcio; glicina, caulim; manitol, cloreto de sódio; inositol, bentonita e semelhantes.

[00254] Em alguns casos, as composições farmacêuticas incluem agentes desintegrantes ou desintegrantes para

facilitar a quebra ou desintegração de uma substância. O termo "desintegrar" inclui tanto a dissolução quanto a dispersão da forma de dosagem quando contatada com líquido gastrointestinal. Exemplos de agentes desintegrantes incluem um amido, por exemplo, um amido natural como, por exemplo, amido de milho ou amido de batata, um amido pré-gelatinizado como, por exemplo, National 1551 ou Amijel®, ou amido glicolato de sódio como, por exemplo, Promogel® ou Explotab®, uma celulose como, por exemplo, um produto de madeira, metilcelulose cristalina, por exemplo, Avicel®, Avicel® PH101, Avicel® PH102, Avicel® PH105, Elcema® P100, Emcocel®, Vivacel®, Ming Tia®, e Solka-Floc®, metilcelulose, croscarmelose, ou uma celulose reticulada como, por exemplo, carboximetilcelulose sódica reticulada (Ac-Di-Sol®), carboximetilcelulose reticulada ou croscarmelose reticulada, um amido reticulado como, por exemplo, amido glicolato de sódio, um polímero reticulado como, por exemplo, crospovidona, uma polivinilpirrolidona reticulada, alginato como, por exemplo, ácido algínico ou um sal de ácido algínico como, por exemplo, alginato de sódio, uma argila como, por exemplo, Veegum® HV (silicato de magnésio-alumínio), uma goma como, por exemplo, ágar, guar, alfarroba, Karaya, pectina ou tragacanto, amido glicolato de sódio, bentonita, uma esponja natural, um tensoativo, uma resina como, por exemplo, uma resina de troca de cátions, polpa cítrica, lauril sulfato de sódio, lauril sulfato de sódio em combinação com amido e semelhantes.

[00255] Em alguns casos, as composições farmacêuticas incluem agentes de enchimento como, por exemplo, lactose, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, fosfato de cálcio

dibásico, sulfato de cálcio, celulose microcristalina, pó de celulose, dextrose, dextrans, dextrans, amidos, amido pré-gelatinizado, sacarose, xilitol, lactitol, manitol, sorbitol, cloreto de sódio, polietileno glicol e semelhantes.

[00256] Lubrificantes e glidantes também são opcionalmente incluídos nas composições farmacêuticas descritas nesse relatório descritivo para a prevenção, redução ou inibição da adesão ou fricção de materiais. Lubrificantes exemplares incluem, por exemplo, ácido esteárico, hidróxido de cálcio, talco, estearil fumarato de sódio, um hidrocarboneto como, por exemplo, óleo mineral, ou óleo vegetal hidrogenado como, por exemplo, óleo de soja hidrogenado (Sterotex®), ácidos graxos superiores e seus sais de metal alcalino e metal alcalino terroso como, por exemplo, alumínio, cálcio, magnésio, zinco, ácido esteárico, estearatos de sódio, glicerol, talco, ceras, Stearowet®, ácido bórico, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio, leucina, um polietileno glicol (por exemplo, PEG-4000) ou um metoxipolietileno glicol como, por exemplo, Carbowax™, oleato de sódio, benzoato de sódio, behenato de glicerila, polietileno glicol, lauril sulfato de magnésio ou sódio, sílica coloidal como, por exemplo, Syloid™, Cab-O-Sil®, um amido como, por exemplo, amido de milho, óleo de silicone, um tensoativo e semelhantes.

[00257] Plasticizantes incluem compostos usados para amolecer o material de microencapsulação ou revestimentos de filme para torná-los menos quebradiços. Plasticizantes adequados incluem, por exemplo, polietileno glicóis como, por exemplo, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350

e PEG 800, ácido esteárico, propileno glicol, ácido oléico, trietil celulose e triacetina. Plasticizantes também podem funcionar como agentes dispersantes ou agentes umidificantes.

[00258] Solubilizantes incluem compostos como, por exemplo, triacetina, trietilcitrato, oleato de etila, caprilato de etila, lauril sulfato de sódio, docusato de sódio, vitamina E TPGS, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxiethylpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetil celulose, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, n-butanol, álcool isopropílico, colesterol, sais biliares, polietileno glicol 200-600, glicofurol, transcutool, propileno glicol e dimetil isosorbida e semelhantes.

[00259] Estabilizantes incluem compostos como, por exemplo, quaisquer agentes antioxidantes, tampões, ácidos, conservantes e semelhantes.

[00260] Agentes de suspensão incluem compostos como, por exemplo, polivinilpirrolidona, por exemplo, polivinilpirrolidona K12, polivinilpirrolidona K17, polivinilpirrolidona K25 ou polivinilpirrolidona K30, copolímero de vinil pirrolidona/acetato de vinila (S630), polietileno glicol, por exemplo, o polietileno glicol pode ter um peso molecular de cerca de 300 até cerca de 6.000, ou cerca de 3.350 até cerca de 4.000, ou cerca de 7.000 até cerca de 5.400, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, acetato estearato de hidroximetilcelulose, polissorbato-80, hidroxietilcelulose, alginato de sódio, gomas como, por exemplo, goma tragacanto e goma acácia, goma guar, xantanas, incluindo goma xantana,

açúcares, celulósicos como, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, carboximetilcelulose sódica, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, polissorbato-80, alginato de sódio, monolaurato de sorbitano polietoxilado, monolaurato de sorbitano polietoxilado, povidona e semelhantes.

[00261] Tensoativos incluem compostos como, por exemplo, lauril sulfato de sódio, docusato de sódio, Tween 60 ou 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitano, monooleato de sorbitano-polioxietileno, polissorbitos, poloxâmeros, sais biliares, monoestearato de glicerila, copolímeros de óxido de etileno e óxido de propileno, por exemplo, Pluronic® (BASF) e semelhantes. Tensoativos adicionais incluem glicerídeos de ácido graxo de polioxietileno e óleos vegetais, por exemplo, polioxietileno (60) óleo mamona hidrogenado; e alquiléteres de polioxietileno e éteres de alquilfenil, por exemplo, octoxinol 10, octoxinol 40. Algumas vezes, tensoativos são incluídos para aumentar a estabilidade física ou para outras finalidades.

[00262] Agentes e aumento da viscosidade incluem, por exemplo, metil celulose, goma xantana, carboximetil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose, hidroxipropilmetil acetato estearato de celulose, ftalato de hidroxipropilmetil celulose, carbômero, álcool polivinílico, alginatos, acácia, quitosanas e combinações destes.

[00263] Agentes de umedecimento incluem compostos como, por exemplo, ácido oléico, monoestearato de glicerila, monooleato de sorbitano, monolaurato de sorbitano,

trietanolamina oleato, monooleato de sorbitano-polioxietileno, polioxietileno monolaurato de sorbitano, docusato de sódio, oleato de sódio, lauril sulfato de sódio, docusato de sódio, triacetina, Tween 80, vitamina E TPGS, sais de amônio e semelhantes.

#### **Regimes terapêuticos**

[00264] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas descritas nesse relatório descritivo são administradas para aplicações terapêuticas. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é administrada uma vez por dia, duas vezes por dia, três vezes por dia ou mais. A composição farmacêutica é administrada diariamente, a cada dia, em dias alternados, cinco dias por semana, uma vez por semana, em semanas alternadas, duas semanas por mês, três semanas por mês, uma vez por mês, duas vezes por mês, três vezes por mês, ou mais. A composição farmacêutica é administrada por pelo menos 1 mês, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 2 anos, 3 anos, ou mais.

[00265] Quando o estado do paciente melhora, a critério do médico, a administração da composição é feita continuamente; alternativamente, a dose da composição que está sendo administrada é temporariamente reduzida ou temporariamente suspensa por certo intervalo de tempo (ou seja, uma "pausa do fármaco"). Em alguns casos, a duração da pausa do fármaco varia entre 2 dias e 1 ano incluindo, apenas como exemplo, 2 dias, 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 15 dias, 20 dias, 28 dias, 35 dias, 50 dias, 70 dias, 100 dias, 120 dias, 150 dias, 180 dias, 200 dias, 250 dias, 280 dias, 300 dias, 320 dias, 350 dias ou

365 dias. A redução da dose durante uma pausa do fármaco é de 10%-100%, incluindo, apenas como exemplo, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100%.

[00266] Após ter ocorrido a melhora da condição do paciente, uma dose de manutenção é administrada, se necessário. Subsequentemente, a dosagem ou a frequência de administração, ou ambas, pode ser reduzida, em função dos sintomas, até um nível no qual a doença, distúrbio ou condição melhorada seja mantida.

[00267] Em algumas modalidades, a quantidade de certo agente que corresponde a essa quantidade varia dependendo de fatores como, por exemplo, do composto particular, da severidade da doença, da identidade (por exemplo, peso) do indivíduo ou hospedeiro que necessita de tratamento, mas, no entanto, é rotineiramente determinada de uma forma conhecida na técnica de acordo com as circunstâncias particulares que circundam o caso incluindo, por exemplo, o agente específico que está sendo administrado, a via de administração, e o indivíduo ou hospedeiro que está sendo tratado. Em alguns casos, a dose desejada é convenientemente apresentada em uma dose única ou como doses divididas administradas simultaneamente (ou ao longo de um período de tempo curto) ou em intervalos apropriados, por exemplo, como duas, três, quatro ou mais subdoses por dia.

[00268] As faixas citadas anteriormente são meramente sugestivas, na medida em que o número de variáveis em relação a um regime de tratamento individual é grande, e variações consideráveis desses valores recomendados não são incomuns. Essas dosagens são alteradas dependendo de diversas

variáveis, não limitadas à atividade do composto usado, à doença ou condição a ser tratada, ao modo de administração, às exigências do paciente individual, à severidade da doença ou condição que está sendo tratada, e à avaliação do profissional.

[00269] Em algumas modalidades, a toxicidade e a eficácia terapêutica desses regimes terapêuticos são determinadas por procedimentos farmacêuticos padronizados em culturas de células ou animais experimentais incluindo, sem limitação, a determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e da ED50 (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população). A proporção da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e é expressa como a proporção entre LD50 e ED50. Compostos que exibem índices terapêuticos elevados são preferidos. Os dados obtidos de ensaios de cultura de células e estudos em animais são usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem desses compostos se situa preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED50 com toxicidade mínima. A dosagem varia dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada.

#### **Kits/artigo manufaturado**

[00270] São revelados nesse relatório descritivo, em certas modalidades, kits e artigos manufaturados para uso com uma ou mais das composições e métodos descritos nesse relatório descritivo. Esses kits incluem um carreador, embalagem ou recipiente que é compartimentalizado para receber um ou mais recipientes como, por exemplo, frascos, tubos e semelhantes, cada um dos recipientes compreendendo

um dos elementos separados a serem usados em um método descrito nesse relatório descritivo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Em uma modalidade, os recipientes são formados por diversos materiais como, por exemplo, vidro ou plástico.

[00271] Os artigos manufaturados fornecidos nesse relatório descritivo contêm materiais de embalagem. Exemplos de materiais de embalagens farmacêuticas incluem, sem limitação, embalagens em *blister*, garrafas, tubos, bolsas, recipientes, garrafas, e qualquer material de embalagem adequado para uma formulação selecionada e modo de administração e tratamento desejados.

[00272] Por exemplo, o(s) recipiente(s) inclui um anticorpo anti-CLDN18.2, como revelado nesse relatório descritivo, células hospedeiras para a produção de um ou mais anticorpos descritos nesse relatório descritivo, e/ou vetores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos descritos nesse relatório descritivo. Esses kits opcionalmente incluem uma descrição ou rótulo de identificação ou instruções relacionadas ao seu uso nos métodos descritos nesse relatório descritivo.

[00273] Um kit tipicamente inclui rótulos que listam o conteúdo e/ou instruções para uso, e bulas com instruções para uso. Um conjunto de instruções tipicamente também será incluído.

[00274] Em uma modalidade, um rótulo está sobre ou associado ao recipiente. Em uma modalidade, um rótulo está em um recipiente quando letras, números ou outros caracteres que formam o rótulo estão anexados, moldados ou gravados no próprio recipiente; um rótulo está associado com um

recipiente quando ele está presente dentro de um receptáculo ou transportador que contém o recipiente, por exemplo, como uma bula. Em uma modalidade, um rótulo é usado para indicar que o conteúdo deve ser usado para uma aplicação terapêutica específica. O rótulo também indica orientações para uso do conteúdo como, por exemplo, nos métodos descritos nesse relatório descritivo.

[00275] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas são apresentadas em uma embalagem ou dispositivo dispensador que contém uma ou mais formas de dosagens unitárias que contém um composto fornecido nesse relatório descritivo. A embalagem, por exemplo, contém uma folha metálica ou plástica como, por exemplo, uma embalagem em *blister*. Em uma modalidade, a embalagem ou dispositivo dispensador é acompanhado por instruções para administração. Em uma modalidade, a embalagem ou dispensador também é acompanhado por um aviso associado com o recipiente em uma forma prescrita por um órgão governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo aviso reflete a aprovação pelo órgão da forma do fármaco para administração humana ou veterinária. Esse aviso, por exemplo, é a rotulagem aprovada pelo FDA ("U.S. Food and Drug Administration" - agência governamental americana que regula e fiscaliza a fabricação de comestíveis, drogas e cosméticos) para fármacos vendidos sob prescrição, ou a bula aprovada do produto. Em uma modalidade, as composições que contém um composto fornecido nesse relatório descritivo formulado em um carreador farmacêutico compatível também são preparadas, colocadas em um recipiente apropriado, e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

**Terminologia correta**

[00276] Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos usados nesse relatório descritivo possuem os mesmos significados comumente subentendidos por aqueles habilitados na técnica à qual o tema reivindicado pertence. Deve ser subentendido que a descrição geral apresentada anteriormente e a descrição detalhada seguinte são apenas exemplares e explanatórias, e não são restritivas de qualquer tema reivindicado. Nesse pedido, o uso do singular inclui o plural, a menos que especificamente observado de outro modo. Deve ser observado que, como usado no relatório descritivo e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem referentes no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Nesse pedido, o uso de "ou" significa "e/ou" a menos que seja afirmado o contrário. Além disso, o uso do termo "que inclui", bem como outras formas como, por exemplo, "incluem", "inclui" e "incluído", não é limitante.

[00277] Como usadas nesse relatório descritivo, faixas e quantidades podem ser expressas como "cerca de" um valor ou faixa particular. O termo "cerca de" também inclui a quantidade exata. Dessa forma, "cerca de 5 µl" significa "cerca de 5 µl" e também "5 µl". Geralmente, o termo "cerca de" inclui uma quantidade que supostamente estaria dentro do erro experimental, por exemplo, dentro de 15%, 10% ou 5%.

[00278] Os cabeçalhos de seções usados nesse relatório descritivo são apenas para fins organizacionais e não devem ser considerados como limitantes do tema descrito.

[00279] Como usados nesse relatório descritivo, os termos "indivíduo(s)", "pessoa(s)" e "paciente(s)" significam

qualquer mamífero. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano. Em algumas modalidades, o mamífero não é um humano. Nenhum dos termos exige ou está limitado às situações caracterizadas pela supervisão (por exemplo, constante ou intermitente) de um profissional de saúde (por exemplo, um médico, uma enfermeira registrada, uma técnica de enfermagem, um assistente de um médico, um funcionário de um asilo ou casa de repouso).

[00280] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável nesse relatório descritivo para se referirem aos polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear, cíclico ou ramificado, e pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também englobam polímeros de aminoácidos que foram modificados, por exemplo, por meio de sulfatação, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação, iodação, metilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenilação, adição de aminoácidos mediada por RNA de transferência a proteínas como, por exemplo, arginilação, ubiquitinação, ou qualquer outra manipulação como, por exemplo, conjugação com um componente de marcação.

[00281] Como usado nesse relatório descritivo o termo "aminoácido" se refere aos aminoácidos naturais e/ou não naturais ou sintéticos, incluindo glicina e os isômeros ópticos D ou L, e análogos de aminoácidos e peptidomiméticos.

[00282] Uma sequência de polipeptídeos ou de aminoácidos "derivada de" uma proteína designada se refere à origem do polipeptídeo. De preferência, o polipeptídeo possui uma

sequência de aminoácidos que é basicamente idêntica àquela de um polipeptídeo codificado na sequência, ou uma porção desta, em que a porção consiste em pelo menos 10-20 aminoácidos, ou pelo menos 20-30 aminoácidos, ou pelo menos 30-50 aminoácidos, ou que é imunologicamente identificável com um polipeptídeo codificado na sequência. Essa terminologia também inclui um polipeptídeo expresso por uma sequência de ácidos nucleicos designada.

[00283] Com relação ao sistema de numeração de Kabat, CDRs dentro de uma molécula da cadeia pesada de anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 31 a 35, que opcionalmente pode incluir um ou dois aminoácidos adicionais, depois da 35 (referidas no esquema de numeração de Kabat como 35A e 35B) (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 65 (CDR2) e posições de aminoácidos 95 a 102 (CDR3). Com o uso do sistema de numeração de Kabat, CDRs dentro de uma molécula da cadeia leve de anticorpo estão tipicamente presentes nas posições de aminoácidos 24 a 34 (CDR1), posições de aminoácidos 50 a 56 (CDR2) e posições de aminoácidos 89 a 97 (CDR3). Como é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica, com a utilização do sistema de numeração de Kabat, a real sequência de aminoácidos linear do domínio variável de anticorpo pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais em função do encurtamento ou alongamento de uma FR e/ou CDR e, dessa forma, o número de Kabat do aminoácido não é necessariamente o mesmo que o de seu número de aminoácido linear.

#### **EXEMPLOS**

[00284] Esses exemplos são fornecidos apenas para fins ilustrativos e não limitam o escopo das reivindicações

fornecidas nesse relatório descritivo.

#### **Exemplo 1 - Alvos e reagentes**

[00285] Células HEK293 e CHO que superexpressam CLDN18.2 foram geradas em NovoBioSci e Genomeditech para fins de imunização e de avaliação. Células HEK293 que expressam CLDN18.2 foram co-expressas com GFP por um IRES. A expressão de GFP e CLDN18.2 foi demonstrada por coloração com um anticorpo marcado com fluorescência contra CLDN18 disponível comercialmente (ab203563) (Fig. 1). A expressão de CLDN18.2 em células CHO foi confirmada por sequenciamento de DNA.

#### **Exemplo 2 - Imunização**

[00286] A imunização de ratos para gerar anticorpo foi realizada usando o seguinte esquema de imunização (Tabela 10). Resumidamente, nas primeiras duas imunizações, dois tipos de construções de DNA, foram usadas somente alças extracelulares 1 DNA (ECL1, Fig. 3) ou DNA de comprimento total de CLDN18.2 (Fig. 2). A terceira imunização foi feita com células HEK293 que superexpressam CLDN18.2, e a quarta imunização foi feita usando o DNA correspondente ou DNA com células que superexpressam CLDN18.2. O reforço final foi feito com células HEK293 que superexpressam CLDN18.2. Quatro ratos foram usados para fusão.

**Tabela 10. Esquema de imunização de ratos.**

<b>Imunização</b>	<b>Antígenos</b>	
1 <sup>a</sup> & 2 <sup>a</sup>	DNA de CLDN18.2 - ECL1	DNA de CLDN18.2 - FL
3 <sup>a</sup>	Células HEK293- CLDN18.2	Células HEK293- CLDN18.2

4 <sup>a</sup>	ECL1 de DNA de CLDN18.2	ECL1 de DNA de CLDN18.2 + células HEK293- CLDN18.2	FL DNA de CLDN18.2	FL DNA de CLDN18.2 + células HEK293- CLDN18.2
Reforço final	Células HEK293-CLDN18.2			
Nº do animal	4518* 4519* 4520*	4521* 4522 4523	4468 4472 4473	4515 4516 4517

\* rato selecionado para fusão

[00287] Para imunização de camundongos (Tabela 11), células CHO ou HEK293 que superexpressam CLDN18.2 foram usados em 4 rodadas de imunização mais reforço final. Quatro camundongos foram usados em cada grupo e 3 fusões foram realizadas para gerar hibridomas.

**Tabela 11. Esquema de imunização de camundongos.**

<b>Imunização</b>	<b>Antígenos</b>	
1 <sup>a</sup> - 4 <sup>a</sup>	Células HEK293- CLDN18.2	Células CHO-CLDN18.2
Reforço	Células HEK293- CLDN18.2	Células CHO-CLDN18.2
Nº do animal	6375 6376* 6377 6378*	6379 6380 6381 6382*

\* camundongo selecionado para fusão

**Exemplo 3 - Avaliação de clones de hibridomas primários para ligação por FACS**

[00288] Sobrenadantes de hibridoma se ligaram especificamente à CHO-CLDN18.2. Um total de 80 placas de 96 poços foi semeado e avaliado por ELISA baseado em células do hibridoma de animais imunizados. Cento e noventa e quatro clones foram identificados como positivos com base em um valor de OD de  $> 0,3$ . Para obter anticorpos que se ligavam especificamente à CLDN18.2, mas não à CLDN 18.1, hibridomas de imunização de ratos e/ou camundongos com linhagens de células modificadas geneticamente, CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2, foram avaliados. Resumidamente, 50  $\mu$ l de células CHO-CLDN18.1 ou CHO-CLDN18.2 (densidade de células:  $2 \times 10^6$  células/ml, viabilidade  $> 90\%$ ) foram incubadas com volume igual de sobrenadante de hibridoma em uma placa de 96 poços a 4°C por 1 hora. Após lavadas com tampão de FACS (DPBS contendo FBS 2%), a mistura de células/anticorpo foi corada com anticorpo secundário (anti-IgG de Rato (H+L) de cabra iFlour 647, Genscript, ou anti-IgG de camundongo de coelho conjugado a Alexa Flour® 647, Jackson ImmunoResearch). Finalmente, a mistura foi lavada e ressuspensa com tampão de FACS, e submetida à análise por FACS em BD FACS Celesta. Os dados brutos foram analisados com o software FlowJo.

[00289] Sete hibridomas de ratos imunizados e 31 hibridomas de camundongos imunizados exibiram ligação específica mais forte às células CHO-CLDN18.2, quando comparada com sua respectiva ligação às células CHO-CLDN18.1.

**Exemplo 4 - Anticorpos purificados se ligam**

**especificamente à CHO-CLDN18.2**

[00290] Anticorpos purificados foram gerados por purificação por afinidade de proteína G do sobrenadantes. Resumidamente, sobrenadante de hibridoma foi centrifugado a 8.000 rpm e 4°C por 30 minutos. A seguir, o sobrenadante foi filtrado com membrana de microfiltração de 0,22 µm. NaCl foi adicionado ao sobrenadante na proporção de 1 g de NaCl para 10 ml de sobrenadante. A amostra de sobrenadante foi carregada na coluna de purificação em uma velocidade de 3 ml por minuto a 4°C. Resina de Proteína G foi equilibrada com 4-5 volumes de coluna de 1 x PBS, e depois lavada com tampão de eluato (0,1 M de Tris, pH 12). Tampão de neutralização foi então imediatamente adicionado ao tubo de coleta contendo o anticorpo eluído para neutralizar o pH. A seguir, o anticorpo eluído foi dialisado contra 1 x PBS em temperatura ambiente por 2 horas. O anticorpo foi subsequentemente armazenado para análise.

[00291] Anticorpos de rato purificados foram testados no ensaio de ligação usando células que superexpressam CLDN18.2 ou CLDN18.1 de acordo com o método descrito acima. Quatro anticorpos de rato purificados 181B7B7, 193H11D8, 184A10D8 e 282A12F3, mostraram ligação específica para CLDN18.2, mas não para CLDN 18.1. Particularmente, 282A12F3 mostrou ligação mais forte à CLDN18.2 do que o anticorpo de referência 175D10, e dois anticorpos de rato purificados 101C6A8 e 186A4B9 se ligaram tanto à CLDN18.1 quanto à CLDN18.2.

[00292] Dezoito anticorpos de camundongo purificados incluindo 325F12H3, 325E8C8, 328G2C4, 350G12E1, 357B8F8, 360F1G1, 364D1A7, 382A11H12, 399H6A10, 406D10H7, 408B9D4,

409E2C5, 413B5B4, 413H9F8, 416E8G10, 417H3B1, 420G5E2 e 429G1B7, mostraram ligação específica à CLDN18.2, mas não à CLDN18.1. Particularmente, 325E8C8, 350G12E1, 357B8F8, 364D1A7, 408B9D4 e 413H9F8 mostraram ligação mais forte à CHO-CLDN18.2 do que o anticorpo de referência 175D10.

**Exemplo 5 - Curva de ligação de anticorpos purificados**

[00293] Curvas de ligação foram geradas para classificar as afinidades de ligação de anticorpos para hibridoma. Resumidamente, um total de  $1 \times 10^5$  células CHO-CLDN18.2 para cada poço foram semeadas em uma placa de 96 poços e lavadas por tampão de FACS (DPBS contendo FBS 2%) duas vezes. As células foram incubadas por anticorpos para hibridoma purificados diluídos em série por 1 h. Após incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas por tampão de FACS por duas vezes. A seguir, as células foram coradas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo de coelho conjugado a Alexa Flour® 647, Jackson ImmunoResearch). Os sinais de Alexa Flúor 647 das células coradas foram detectados por BD FACS Celesta e os sinais da fluorescência média geométrica foram determinados. O software FlowJo foi usado para análise. Os dados foram plotados como o logaritmo da concentração de anticorpo versus sinais da fluorescência média. Análise de regressão não linear foi realizada por GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) e os valores da  $EC_{50}$  foram calculados.

[00294] Como mostrado na Fig. 4A-Fig. 4C, anticorpos anti-CLDN18.2 gerados em camundongo purificados mostraram uma ligação dose-dependente em células CHO-CLDN18.2. Cinco anticorpos, 325E8C8, 350G12E1, 364D1A7, 408B9D4 e 413H9F8, de um total de 18 anticorpos testados mostraram a maior

ligação máxima, comparados com aquela do anticorpo de referência 175D10 (Fig. 4A). Cinco anticorpos, 417H3B1, 413B5B4, 357B8F8, 360F1G1 e 429G1B7, mostraram ligação máxima maior do que aquela de 175D10, mas menor do que os anticorpos 325E8C8, 350G12E1, 364D1A7, 408B9D4 e 413H9F8 (Fig. 4B). Anticorpos adicionais testados mostraram ligação máxima similar ou mais fraca, comparada com aquela de 175D10 (Fig. 4C). As  $EC_{50}$ s de anticorpos anti-CLDN18.2 selecionados à CLDN18.2 foram cerca de 10 nM ou menos (Tabela 12).

**Tabela 12. Afinidades de ligação ( $EC_{50}$ s) às células CHO-CLDN18.2 de anticorpos derivados de clones de hibridomas de camundongo imunizados.**

<b>Anticorpos</b>	<b><math>EC_{50}</math>, nM</b>
325E8C8	3,86
325F12H3	na.
328G2C4	2,79
350G12E1	5,17
357B8F8	3,26
360F1G1	na.
364D1A7	5,22
382A11H12	na.
399H6A10	6,71
406D10H7	1,64
408B9D4	6,73
409E2C5	na.
413B5B4	4,07
413H9F8	8,30
416E8G10	10,97
417H3B1	4,34
420G5E2	3,24

429G1B7	na.
Ms175D10	3,68
MsIgG2aK	na.

[00295] O termo "na". usado nesse relatório descritivo e nas tabelas seguintes indica "não aplicável".

**Exemplo 6 - Ligação de anticorpos às linhagens de células de câncer gástrico**

[00296] As linhagens de células de câncer gástrico SNU601 e SNU620 possuem expressão endógena de CLDN18.2. A expressão de CLDN18.2 em células SNU601 e SNU620 foi confirmada por RT-PCR usando iniciadores específicos para CLDN18.2 e sequenciamento de DNA. Células SNU601 e SNU620 com nível elevado de expressão de CLDN18.2 foram separadas para o ensaio de ligação. O ensaio de ligação foi realizado como descrito previamente. Os clones gerados em ratos 282A12 e 101C6 e o anticorpo de referência 175D10 se ligaram à linhagem de câncer gástrico SNU601, mas os clones 282A12 e 101C6 também se ligaram à SU620 (Fig. 5A e Fig. 5B).

[00297] A linhagem de células SNU620 foi usada para determinação das afinidades de ligação de anticorpos monoclonais de camundongo à CLDN18.2 endógena expressa. Todos os anticorpos positivos de camundongos imunizados foram testados na concentração final de 10 µg/ml. Quinze dos 18 anticorpos monoclonais de camundongo, incluindo 325F12H3, 325E8C8, 328G2C4, 350G12E1, 360F1G1, 364D1A7, 406D10H7, 408B9D4, 409E2C5, 413B5B4, 413H9F8, 416E8G10, 417H3B1, 420G5E2 e 429G1B7, mostraram ligação mais forte à SU620, comparados com 175D10. Particularmente, 413H9F8, 364D1A7 e 408B9D4 se ligaram às células de câncer SNU620 fortemente.

[00298] Em resumo, anticorpos como, por exemplo,

282A12F3, 364D1A7 e 413H9F8, se ligaram às células CHO-CLDN18.2 e de câncer gástrico SNU620 especificamente (Tabela 13).

**Tabela 13. Resumo de atividades de ligação de anticorpos específicos para CLDN18.2.**

	CHO-18.1 (@ 30 µg/ml)	CHO-18.2 (@ 30 µ/ml)	SNU620 (@ 10 µ/ml)	Isótipo
175D10	-	++	-	IgG
282A12	-	+++	++	IgG
325F12H3	-	++	+	IgG
328G2C4	-	+	+	IgG
360F1G1	+	++	+	IgG
382A11H12	na	na	na	IgM
399H6A10	+	++	+	IgG
406D10H7	-	+	+	IgG
420G5E2	-	+	+	IgG
429G1B7	+	+++	+	IgG
409E2C5	-	+++	+	IgG
413B5B4	-	+++	+	IgG
416E8G10	+	++	+	IgG
417H3B1	-	+++	+	IgG
325E8C8	-	+++	+	IgG
350G12E1	-	+++	+	IgG
357B8F8	-	+++	-	IgG
364D1A7	-	+++	++	IgG
408B9D4	-	+++	++	IgG
413H9F8	-	+++	++	IgG

#### Exemplo 7 - Quimerização

[00299] Anticorpos murídeos e de ratos foram quimerizados

por expressão de região variável da cadeia leve murídea e de ratos no plasmídeo pCDNA3.1(+) que compreende uma sequência de DNA que codifica aminoácidos de uma sequência sinalizadora e uma região constante de IgG1 humana. As sequências de regiões constantes da cadeia pesada e leve (CH e CL) de IgG1 humana são mostradas na Tabela 4.

[00300] As afinidades de ligação de anticorpos quiméricos na linhagem de células CHO-CLDN18.2 foram determinadas como descrito previamente. Como mostrado nas Figs. 6A-Fig. 6D, os anticorpos quiméricos 282A12F3, 64D1A7 e 413H9F8 se ligam especificamente à CLDN18.2. 282A12F3, 64D1A7 e 413H9F8 quiméricos mostraram afinidades de ligação mais fortes, comparados com o anticorpo de referência 175D10.

**Exemplo 8 - Análise de sequência de anticorpo e remoção de sítios de modificação pós-tradução**

[00301] As sequências de anticorpos produzidos por tecnologia de hibridoma foram analisadas quanto às modificações pós-tradução (PTMs) que, algumas vezes, causam problemas durante o desenvolvimento de uma proteína terapêutica como, por exemplo, heterogeneidade aumentada, bioatividade reduzida, estabilidade reduzida, imunogenicidade, fragmentação e agregação. O impacto potencial de PTMs depende de sua localização e, em alguns casos, de exposição ao solvente. As CDRs de todas as sequências foram analisadas quanto à desaminação de asparagina, isomerização de aspartato, grupos tiol de cisteína livres, N-glicosilação, oxidação e fragmentação por sítios de hidrólise potenciais.

[00302] Múltiplos alinhamentos das sequências parentais para as sequências da linhagem germinativa humana foram

realizados usando a ferramenta Igbblast. Com base no alinhamento da sequência do anticorpo parental para as linhagens germinativas humanas, foram identificadas as maiores entradas de homologia.

[00303] Modelos estruturais dos anticorpos 282A12F3, 413H9F8 e 364D1A7 foram gerados usando um protocolo customizado de "Build Homology Models". Os fragmentos do modelo estrutural candidato foram pontuados, classificados e selecionados do banco de dados de PDB com base em sua identidade de sequência para o alvo, bem como nas medições cristalográficas qualitativas da estrutura do modelo. Com base nos dados da modelagem de homologia para 282A12F3, 413H9F8, 364D1A7 individualmente, resíduos expostos na região de arcabouço (FR) e regiões CDR foram identificados, e os sítios de PTM potenciais na superfície da estrutura da proteína foram realçados. Com base nos dados de análise de PTM e na identidade de sequência para o modelo da linhagem germinativa humana, três anticorpos, 282A12F3, 413H9F8 e 364D1A7, foram utilizados como anticorpos parentais para humanização posterior.

[00304] O teste de ligação de mutantes com sítios de PTM removidos foi feito em células que expressam CLDN18.2 ou CLDN18.1, juntamente com o anticorpo de referência 175D10 como controle positivo. Como mostrado nas Figs. 7A-Fig. 10B, após remoção de sítios de PTM potenciais, 282A12F3-VH-N60Q, 282A12F3-VH-N60E e 282A12F3(T62A) do clone de 282A12F3, 413H9F8-VL-N31E, 413H9F8-VL-S32L e 413H9F8-VL-S32V do clone de 413H9F8, e 364D1A7-VL-N31E, 364D1A7-VL-S32L e 364D1A7-VL-S32V do clone de 364D1A7 mostraram ligação específica às células CHO-CLDN18.2, ao invés de linhagens de células CHO-

CLDN18.1. Todos os anticorpos com remoção de sítios de PTM potenciais tiveram ligação mais forte, comparados com o anticorpo de referência 175D10 às células CHO-CLDN18.2. 357B8F8-VH-N60E-VL-N31E, 357B8F8-VH-N60E-VL-S32I, 357B8F8-VH-S61I-VL-N31E e 357B8F8-VH-S61I-VL-S32I do clone de 357B8F8 mostraram ligação específica às células CHO-CLDN18.2; no entanto, somente 357B8F8-VH-S61I-VL-S32I mostrou afinidade de ligação comparável com 175D10 (xi175D10) às células CHO-CLDN18.2.

[00305] Os clones quiméricos com mutações de remoção de PTM foram testados quanto à sua ligação à SNU620 com expressão de CLDN18.2 endógena como descrito acima. Como mostrado nas Figs. 11A-Fig. 11C, as variantes de 413H9F8 e 364D1A7 se ligaram à SNU620 em níveis diferentes. Os mutantes S32V e S32L mostraram melhor atividade de ligação às células CHO-CLDN18.2 e SNU620 do que o mutante N31E. O clone 413H9F8 mostrou melhor atividade de ligação à CLDN18.2 do que 364D1A7. 357B8F8 quimérico, e suas variantes de remoção de PTM, não puderam se ligar à linhagem de células de câncer SNU620, que é similar ao anticorpo de referência 175D10.

#### **Exemplo 9 - Ligação competitiva de anticorpos quiméricos**

[00306] Para investigar o grupo de ligação ao epitopo de anticorpos de ligação à CLDN18.2, quatro anticorpos quiméricos foram testados quanto às suas atividades de ligação competitiva usando células CHO-CLDN18.2. A concentração de trabalho de cada anticorpo foi determinada por ensaio de ligação baseado em células CHO-CLDN18.2. As células foram coletadas e lavadas com PBS, e depois  $1 \times 10^5$  células em 50  $\mu$ l em PBS foram adicionadas em uma placa de 96 poços. Os anticorpos de teste foram diluídos de 60  $\mu$ g/ml com

PBS em séries de 3 vezes por 12 pontos e 50 µl de anticorpos diluídos foram misturados com as células, e incubados a 4°C por 120 min. A seguir, os poços foram lavados com PBS. Para ensaios de ligação competitiva, 100 µl de anticorpos anti-CLDN18.2 marcados com biotina foram adicionados na concentração de trabalho (5, 1, 0,5 e 1 µg/ml de xil75D10, 282A12F3 (T62A), 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V respectivamente). Anti-Fc de IgG humana de cabra marcado com biotina foi adicionado na diluição de 1:800 a 100 µl/poço como o controle. As placas foram incubadas a 4°C por 40 min. Estreptavidina-APC (1:1.700) foi usada para detectar anticorpo marcado com biotina. Citometria de fluxo foi realizada para medir a ligação.

[00307] A ligação de 175D10 em CHO-CLDN18.2 foi completamente inibida por 282A12F3 (T62A), 413H9F8-VL-S32V ou 364D1A7-VL-32V (Figs. 12A-Fig. 12D). A ligação de 282A12 (T62A) em CHO-CLDN18.2 foi completamente inibida por 413H9F8-VL-S32V ou 364D1A7-VL-S32V, parcialmente inibida por 175D10. A ligação de 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V em CHO-CLDN18.2 foi parcialmente inibida por 175D10 ou 282A12F3 (T62A).

**Exemplo 10 - Atividade de ligação cruzada em CLDN18.2 de camundongo e de *Cynomolgus***

[00308] A reatividade cruzada entre espécies permite a avaliação do candidato clínico em modelos de farmacologia (camundongos) e modelos de toxicidade (macaco *Cynomolgus*). A reatividade cruzada entre espécies de anticorpos anti-CLDN18.2 humana foi determinada por ensaio de ligação baseado em células. A ligação dos anticorpos monoclonais identificados à CLDN18.2 murídea e de *Cynomolgus* foi

analisada por citometria de fluxo. Células HEK293 foram co-transfectadas transitoriamente com um marcador de fluorescência e CLDN18.2 murídea e CLDN18.2 de *Cynomolgus*. Resumidamente,  $2,5 \times 10^6$  células HEK-293 por placa foram plaqueadas em duas placas de 10 cm<sup>2</sup> com 10 ml de meio DMEM para cada placa. Vinte e quatro horas após o plantio, as células foram transfectadas com plasmídeos de GFP-CLDN18.2 de camundongo e GFP-CLDN18.2 de *Cynomolgus*. Uma massa total de plasmídeo de 10 µg por placa foi transfectada usando 20 µl de Lipofectamina 2000 (Life Technologies). O meio de cultura foi trocado 5 h após transfecção. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram dissociadas e preparadas para detecção da afinidade de ligação. A linhagem estável de células HEK293-GFP-CLDN18.2, que expressam CLDN18.2 humana, foi usada para detectar GFP-CLDN18.2 humana.

[00309] As afinidades de ligação de anticorpos anti-CLDN18.2 humana foram determinadas em células que superexpressam CLDN18.2 humana, de camundongo e de *Cynomolgus*. Resumidamente,  $1 \times 10^5$  células para cada poço foram semeadas em uma placa de 96 poços e lavadas por tampão de FACS (D-PBS contendo FBS 2%) por duas vezes. As células foram incubadas por anticorpos anti-CLDN18.2 diluídos em série por 1 h. O grupo de controle compreendeu células de câncer incubadas com IgG1 humana. Após incubação do anticorpo primário, as células foram lavadas por tampão de FACS por duas vezes. A seguir, as células foram coradas por anticorpo secundário anti-IgG humana marcado com Alexa Flúor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) por 30 min a 4°C. Os sinais de Alexa Flúor 647 e GFP das células coradas foram

detectados por BD FACS Celesta e os sinais da fluorescência média geométrica foram determinados. O software FlowJo foi usado para análise. Os dados foram plotados como a concentração de anticorpo versus proporção de fluorescência média por Alexa Fluor 647 /GFP. Análise de regressão não linear foi realizada por GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Como mostrado nas Figs. 13A-Fig. 13E, variantes de anticorpos quiméricos 413H9F8, 364D1A7 e 357B8F8, 282A12(T62A) humanizado (hz282-11) e anticorpo de referência 175D10 reagiram de forma cruzada com CLDN18.2 de camundongo e de *Cynomolgus*. Todos os anticorpos testados mostraram ligação mais forte à CLDN18.2 humana, comparados àqueles de CLDN18.2 de *Cynomolgus* e de camundongo.

**Exemplo 11 - Citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) de anticorpos quiméricos**

**Anticorpos quiméricos anti-CLDN18.2 induziram ADCC específica em células CHO-CLDN18.2.**

[00310] A especificidade da ADCC induzida por anticorpos anti-CLDN18.2 foi testada em células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2. As células-alvo, CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2, foram marcadas por CFSE (Life tecnologia) em uma concentração final de 2,5  $\mu$ M por 30 min. A concentração de célula-alvo foi ajustada para  $2 \times 10^5$  células/ml, células efetoras (FcR-TANK (CD16A-15V), que consistiam em uma linhagem de células NK92 modificadas geneticamente que superexpressam CD16a desenvolvida por ImmuneOnco), foram ajustadas para  $8 \times 10^5$  células/ml. A seguir, 50  $\mu$ l de suspensão de célula-alvo, 100  $\mu$ l de suspensão de célula efetora e 50  $\mu$ l de anticorpos diluídos em série foram misturados em cada poço (a proporção de célula efetora/célula-alvo foi de 8:1). Poços em duplicata

foram preparados para cada concentração de anticorpo. O grupo de controle compreendeu células de câncer incubadas somente com células efetoras. Após incubação a 37°C, CO2 5% por 4-16 h, 1 µg/ml de 7-AAD (Invitrogen) foi adicionado e analisado por citometria de fluxo (BD FACS Celesta). ADCC foi calculada pela fórmula:  $ADCC \% = \% \text{ de células 7-AAD-positivas com anticorpo} - \% \text{ de células 7-AAD-positivas sem anticorpo}$ .

**Anticorpos anti-CLDN18.2 e células FcR-TANK (CD16A-15V) induziram ADCC nas linhagem de células gástricas NCI-N87-CLDN18.2**

[00311] A ADCC de anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados foi testada em células de câncer NCI-N87. As células-alvo foram marcadas por CFSE (Life tecnologia) na concentração final de 2,5 µM por 30 min. A concentração de célula-alvo marcadas foi ajustada para 2 x 10<sup>5</sup> células/ml, e as células efetoras (FcR-TANK (CD16A-15V) foram ajustadas para 8 x 10<sup>5</sup> células/ml. A seguir, 50 µl de suspensão de célula-alvo, 100 µl de suspensão de célula efetora e 50 µl de anticorpos diluídos em série foram misturados em cada poço (a proporção de célula efetora/célula-alvo foi de 8:1). Poços em duplicata foram preparados para cada concentração de anticorpo. O grupo de controle compreendeu células de câncer incubadas somente com células efetoras. Após incubação a 37°C, CO2 5% por 4-16 h, 1 µg/ml de 7-AAD (Invitrogen) foi adicionado e analisado por citometria de fluxo (BD FACS Celesta). ADCC foi calculada pela fórmula:  $ADCC \% = \% \text{ de células 7-AAD-positivas com anticorpo} - \% \text{ de células 7-AAD-positivas sem anticorpo}$ .

**Células mononucleares humanas do sangue periférico**

**(PBMC) induziram ADCC na linhagem de células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2**

[00312] A ADCC de anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados induzida por PBMCs foi testada em células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2. PBMCs criopreservadas (AllCells) de um indivíduo saudável foram descongeladas um dia antes do ensaio e cultivadas de um dia para o outro em meio RPMI-FBS 10% com 200 IU de IL-2 (R&D) em uma incubadora de CO<sub>2</sub>. As células-alvo foram marcadas por CFSE (Life tecnologia) na concentração final de 2,5 µM por 15 min. Após coloração, a concentração de células foi ajustada para 6 x 10<sup>4</sup> células/ml e misturada com um volume de 2 vezes de PBMCs que foram ajustadas para 1 x 10<sup>6</sup> células/ml (a proporção de célula efetora/célula-alvo foi de 40:1). A seguir, 150 µl de suspensão mista de célula-alvo e de célula efetora e 50 µl de anticorpos diluídos em série foram misturados em cada poço. Poços em duplicata foram preparados para cada concentração de anticorpo. Célula-alvo isoladamente foi o grupo de controle. Após incubação a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% por 5 h, 1 µg/ml de PI (Invitrogen) foi adicionado e analisado por citometria de fluxo (BD FACS Celesta). A citotoxicidade específica foi calculada pela fórmula: citotoxicidade específica = % de células PI-positivas com anticorpo - % de células PI-positivas sem anticorpo.

[00313] mAb tumor-específico pode exercer seus efeitos por meio de mecanismos baseados em Fc, incluindo citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC). A função de ADCC de anticorpos quiméricos CLDN18.2-específicos foi analisada por ADCC induzida pela linhagem de células NK ou PBMC na presença de anticorpos selecionados.

Como mostrado na Fig. 14A-Fig. 14B, anticorpos quiméricos foram analisados quanto à sua capacidade para induzir ADCC com células FcR-TANK (CD16A-15V) contra células CHO com expressão estável de CLDN18.1 humana (CHO-CLDN18.1) ou CLDN18.2 humana (CHO-CLDN18.2). Anticorpos CLDN18.2-específicos, 282A12F3 (T62A), xi175D10, 413H9F8 e 364D1A7, induziram lise mediada por ADCC de CHO-CLDN18.2, mas não CHO-CLDN18.1. O clone 101C6, que se liga tanto à CLDN18.1 quanto à CLDN18.2, induziu atividade de ADCC tanto contra células CHO-CLDN18.1 quanto contra células CHO-CLDN18.2. A atividade de ADCC específica de 282A12F3 (T62A), xi175D10, 413H9F8 e 364D1A são consistentes com seus perfis de ligação específica à CLDN18.2.

[00314] A linhagem de câncer gástrico NCI-N87 com expressão estável de CLDN18.2 humana (NCI-N87-CLDN18.2) foi usada como célula-alvo para testar as atividades de ADCC de anticorpos quiméricos. Como mostrado na Fig. 15 e na Tabela 14, 282A12F3 (T62A), anticorpo de referência 175D10, 413H9F8 e 364D1A7 induziram lise mediada por ADCC de células NCI-N87-CLDN18.2. Clone 282A12F3, 413H9F8 e 364D1A7 exibiram atividade de ADCC mais forte do que o anticorpo de referência 175D10, enquanto 357B8F8 mostrou menos atividade. Foi demonstrado que as variantes de Fc S239D/I332E medeiam atividade de ADCC aumentada de anticorpos (Lazar, e cols., "Engineered Antibody Fc Variants with Enhanced Effector Function", *PNAS USA* 2006; **103**: 4.005-4,010). As mutações S239D/I332E na Fc de 175D10 foram introduzidas para aumentar a atividade de ADCC (175D10-V2). Como mostrado na Fig. 15 e na Tabela 14, 175D10 com mutações S239D/I332E em Fc (xi175D10-V2) teve atividade de ADCC mais forte do que seu

anticorpo parental 175D10.

[00315] Para validar ainda mais a função de CLDN18.2 específicos anticorpos, PBMCs criopreservadas de doadores humanos saudáveis foram usadas para testar suas atividades de ADCC contra outra linhagem de câncer gástrico NUGC4 com expressão estável de CLDN18.2 (NUGC4-CLDN18.2). Como mostrado na Fig. 16 e NA Tabela 15, 282A12F3 (T62A), xi175D10, 413H9F8 e 364D1A7 induziram lise mediada por ADCC de células NUGC4-CLDN18.2 de uma forma concentração-dependente. 282A12F3, 357B8F8, 413H9F8 e 364D1A7 mostraram atividade de ADCC mais forte do que o anticorpo de controle 175D10, e 413H9F8 mostrou a maior citotoxicidade específica máxima.

**Tabela 14. Atividade de ADCC do anticorpo quimérico sobre a linhagem de células NCI-N87-18.2.**

<b>Anticorpo</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM*</b>
282A12F3 (T62A)	73,24
xi175D10	96,43
xi175D10-V2	3,51
357B8F8-VH-S61I-VL-S32I	158,60
413H9F8-VL-S32L	8,56
413H9F8-VL-S32V	7,84
364D1A7-VL-S32L	9,56
364D1A7-VL-S32V	12,02
hIgG1	na.

\* Média de 2 experimentos independentes

**Tabela 15. Atividade de ADCC de anticorpos quiméricos sobre a linhagem de células NUGC4-CLDN18.2.**

<b>Anticorpo</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM</b>	<b>% de citotoxicidade específica @ 6.67 nM</b>
------------------	----------------------------	---

413H9F8-VL-S32V	7,69	31,4
364D1A7-VL-S32V	6,36	26,6
357B8F8-VH-S61I- VL-S32I	4,87	19,6
282A12F3 (T62A)	9,52*	21,0
xi175D10	9,21	16,8
hIgG1	na.	-0.8

\*Dados de 1 doador. Dados restantes indicam uma média de 3 doadores.

**Exemplo 12 - Atividades de citotoxicidade complemento-dependente (CDC) de anticorpos quiméricos**

[00316] Em alguns casos, mAbs tumor-específicos também exercem seus efeitos por meio de citotoxicidade complemento-dependente (CDC). Soro humano e linhagens de células CHO-CLDN18.2 foram usados para validar a função de CDC de anticorpos quiméricos. Cinquenta  $\mu$ l de  $3 \times 10^4$  células CHO-CLDN18.2 foram misturados com 25  $\mu$ l de mAbs quiméricos anti-CLDN18.2 humana diluídos serialmente, incubados por 15-30 min em temperatura ambiente. Vinte e cinco  $\mu$ l de soro humano 40% foram adicionados para obter uma concentração de soro final de 10%. Após incubação a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% por 30 min, 1  $\mu$ g/ml de PI (Invitrogen) foi adicionado e analisado por citometria de fluxo (BD FACS Celesta).

[00317] Como mostrado na Fig. 17, anticorpos quiméricos, 282A12F3 (T62A), xi175D10, 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V induziram lise mediada por CDC de CHO-CLDN18.2. Anticorpos 282A12F3 (T62A), 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V induziram CDC mais forte, comparados com o anticorpo de referência 175D10.

**Exemplo 13 - Humanização de anticorpos anti-CLDN18.2**

**exemplares****Humanização do anticorpo 282A12F3**

[00318] A humanização de anticorpo murídeo foi realizada por enxerto de resíduos de CDRs de anticorpo de camundongo em um arcabouço de linhagem germinativa humana. Primeiro, as sequências da região VH e VL de candidatos selecionados foram comparadas com sequências da linhagem germinativa humana, e os aceitadores da linhagem germinativa de melhor ajuste foram selecionados com base na homologia, estrutura canônica e propriedades físicas. Subsequentemente, os modelos de estrutura de candidatos foram gerados usando modelagem de homologia. As regiões CDR tanto nas cadeias pesadas quanto nas cadeias leves de anticorpos candidatos foram fixadas e os arcabouços murídeos foram substituídos com arcabouços da linhagem germinativa humana selecionados. Resíduos diferentes entre arcabouços de camundongo e humanos que potencialmente influenciam a conformação da CDR foram submetidos à retromutação. Fragmentos de DNA que codificam as variantes humanizadas projetadas foram sintetizados e subclonados em vetores de expressão de IgG. As sequências de DNA foram confirmadas por sequenciamento. Combinações diferentes de cadeias pesadas e leves humanizadas foram co-transfectadas em CHO-K1 para expressão. Os anticorpos humanizados foram comparados com o anticorpo parental em afinidade de ligação ao antígeno, por exemplo, por FACS, em células que expressam o antígeno-alvo.

[00319] Há um sítio de glicosilação na sequência VH que foi mutado de T para A. A sequência também não continha cisteína livre ou motivos de degradação de Asn/Asp NG ou DG. A sequência original VH de 282A12 (ID. DE SEQ. N°: 40) e VL

de 282A12 (ID. DE SEQ. N°: 44) foi inserida em BLAST para análise; e a sequência do melhor sítio de mutação foi selecionada de acordo com análise de homologia para enxerto de CDR.

[00320] Os IDS. DE SEQ. N°s: 65-68 ilustram 4 sequências VH de 282A12 variantes e os IDS. DE SEQ. N°s: 69-73 ilustram 5 sequências VL de 282A12 variantes.

[00321] A Tabela 6 ilustra as combinações de cadeia pesada e leve humanizadas de 282A12F3 (T62A).

#### **Humanização do anticorpo 413H9F8-VL-S32V**

[00322] Duas estratégias com uma abordagem de enxerto de CDR ligeiramente diferente foram utilizadas para o design de humanização de 413H9F8-VL-S32V. Os IDS. DE SEQ. N°s: 74-76 ilustram 3 sequências VH de 413H9F8 variantes e IDS. DE SEQ. N°s: 77-80 ilustram 4 sequências VL de 413H9F8 variantes que utilizaram uma primeira estratégia. A Tabela 7 ilustra as combinações de cadeia pesada e leve humanizadas de derivados de 413H9F8-VL-S32V.

[00323] Sob uma segunda estratégia, os IDS. DE SEQ. N°s: 81-84 ilustram 4 sequências VH de 413H9F8 variantes e os IDS. DE SEQ. N°s: 85-88 ilustram 4 sequências VL de 413H9F8 variantes. A Tabela 8 ilustra as combinações de cadeia pesada e leve humanizadas de derivados de 413H9F8-VL-S32V.

#### **Humanização de 364D1A7-VL-S32V**

[00324] Os IDS. DE SEQ. N°s: 89-92 ilustram 4 sequências VH 364D1A7 variantes e os IDS. DE SEQ. N°s: 93-97 ilustram 5 sequências VL de 364D1A7 variantes. A Tabela 9 ilustra as combinações de cadeia pesada e leve humanizadas de derivados de 364D1A7-VL-S32V.

#### **Exemplo 14 - Atividades de ligação de anticorpos**

**282A12F3 (T62A) humanizados**

[00325] As afinidades e especificidades de ligação de anticorpos humanizados foram comparadas com aquelas do anticorpo parental por análise por FACS usando células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2 descrita acima. Como mostrado na Fig. 18A-Fig. 18B, clones humanizados de 282A12F3 (T62A), incluindo hz282-3, hz282-4, hz282-8, hz282-10, hz282-11, hz282-12, hz282-15, hz282-19 e hz282-10, mostraram afinidades de ligação similares à CHO-CLDN18.2 com 282A12F3 (T62A). Nenhum dos clones humanizados se ligou à CHO-CLDN18.1. Os dados indicam que os anticorpos 282A12F3 (T62A) humanizados retinham especificidade e afinidade de ligação para CLDN18.2.

[00326] As afinidades de ligação de clones humanizados de 282A12T62A foram ainda validadas na célula de câncer gástrico SNU620. Como mostrado nas Fig. 19A-Fig. 19B, a maioria dos clones humanizados de 282A12T62A mostrou afinidades de ligação elevadas às células de câncer SNU620. Anticorpos que compreendem as cadeias pesadas de 282A2-VH<sub>g0</sub>, por exemplo, hz282-1, hz282-5, hz282-9, hz282-13 e hz282-17, não se ligaram à SNU620, indicando que pelo menos 2 resíduos, K e V, na FR3 da região V<sub>h</sub> de 282A12(T62A) estão envolvidos na ligação à SNU620 (Tabela 6).

[00327] Os dados das afinidades e especificidade de ligação estão resumidos na Tabela 16. A maior parte dos anticorpos humanizados de 282A12 (T62A) reteve a especificidade e afinidade dos anticorpos paternos.

**Tabela 16. Resumo de atividades de ligação de anticorpos humanizados 282A12 (T62A) na linhagem de células CHO-CLDN18.2 e na linhagem de células de câncer SNU620.**

ID	Exp. 1	Exp. 2		Exp. 3	
	MFI_CHO-18.2/CHO-8.1 (@ 30 µ/ml)	MFI_CHO-18.2/CHO-18.1 (@ 30 µ/ml)	EC <sub>50</sub>	MFI_SNU620 (@ 30 µ/ml)	EC <sub>50</sub>
huIgG1	1,1	1,0	-	15,7	-
Xi-175D10	1034,6	1388,8	1,21	81,5	-
Xi-282A12	810,8	768,2	0,66	1519	2,88
hz282-1	261,9	-	-	69,6	48,23
hz282-2	521,4	-	-	1061	2,56
hz282-3	1101,6	1674,0	0,63	1154	2,78
hz282-4	1237,7	2538,8	0,78	1082	3,35
hz282-5	309,5	-	-	135	81,18
hz282-6	521,3	-	-	1289	3,66
hz282-7	623,9	-	-	1254	2,73
hz282-8	959,5	1608,1	0,69	1191	3,33
hz282-9	162,7	-	-	308	9773,00
hz282-10	807,9	1504,9	0,58	1314	2,25
hz282-11	1186,4	2000,7	0,60	1336	2,02

hz282-12	1226,1	1935,4	0,62	1224	2,09
hz282-13	200,8	-	-	144	35,79
hz282-14	797,9	-	-	1225	2,72
hz282-15	1380,5	2015,7	0,62	1232	2,24
hz282-16	550,0	-	-	1278	3,30
hz282-17	248,8	-	-	176	46,18
hz282-18	781,3	-	-	1212	3,08
hz282-19	812,5	1006,4	0,59	1313	2,29
hz282-20	980,6	987,1	0,81	1236	2,50

-, Não testado ou não aplicável

**Exemplo 15 - Atividades de ligação de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V**

[00328] As afinidades e especificidades de ligação de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V foram comparadas com aquelas dos anticorpos parentais por análise por FACS usando células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2. Como mostrado nas Fig. 20A-Fig. 20D, Fig. 21A-Fig. 21D, Tabela 17, e na Tabela 18, todos os anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V testados mostraram afinidades de ligação comparáveis com 413H9F8-VL-S32V em células CHO-CLDN18.2. Como mostrado nas Fig. 22A-Fig. 22E e na Tabela 19, todos os anticorpos humanizados testados 364D1A7-VL-S32V mostraram afinidades de ligação comparáveis com 364D1A7-VL-S32V em células CHO-CLDN18.2. As afinidades de ligação de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V foram ainda validadas na célula de câncer gástrico SNU620. Como mostrado na Fig. 23A-Fig. 23C, todos os anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V testados mostraram afinidades similares às células de câncer gástrico SNU620, comparados com seus anticorpos parentais. Os dados indicam que os anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V retiveram especificidade e afinidade de ligação.

Tabela 17. EC<sub>50s</sub> da ligação de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V (estratégia 1) em células CHO-CLDN18.2.

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>
413H9F8-cp1	2,60
413H9F8-cp2	1,99
413H9F8-cp3	2,09
413H9F8-cp4	2,28

413H9F8-cp5	2,54
413H9F8-cp6	2,32
413H9F8-cp7	2,47
413H9F8-cp8	2,72
413H9F8-cp9	2,21
413H9F8-cp10	3,69
413H9F8-cp11	2,61
413H9F8-cp12	3,01
413H9F8-VL-32V	1,84
xi175D10	9,32
hz282-11	3,68
282A12F3 (T62A)	4,45

**Tabela 18. EC<sub>50s</sub> da ligação de anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V (na estratégia 2) em CHO-CLDN18.2.**

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>
413H9F8-H1L1	2,31
413H9F8-H2L1	2,43
413H9F8-H3L1	2,42
413H9F8-H4L1	2,69
413H9F8-H1L2	2,18
413H9F8-H2L2	1,97
413H9F8-H3L2	2,14
413H9F8-H4L2	2,45
413H9F8-H1L3	2,38
413H9F8-H2L3	2,49
413H9F8-H3L3	2,24
413H9F8-H4L3	2,62
413H9F8-H1L4	3,32

413H9F8-H2L4	2,80
413H9F8-H3L4	2,74
413H9F8-H4L4	2,34
413H9F8-VL-32V	2,14
xi175D10	7,52
hz282-11	3,17

**Tabela 19. EC<sub>50s</sub> da ligação de anticorpos humanizados 364D1A7 em CHO-CLDN18.2.**

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub> (nM)</b>
364D1A7-H1L1	3,50
364D1A7-H2L1	3,47
364D1A7-H3L1	4,22
364D1A7-H4L1	4,12
364D1A7-H1L2	6,90
364D1A7-H2L2	6,14
364D1A7-H3L2	4,05
364D1A7-H4L2	4,51
364D1A7-H1L3	4,10
364D1A7-H2L3	4,40
364D1A7-H3L3	3,54
364D1A7-H4L3	4,56
364D1A7-H1L4	4,03
364D1A7-H2L4	3,94
364D1A7-H3L4	4,78
364D1A7-H4L4	3,85
364D1A7-H1L5	3,96
364D1A7-H2L5	3,35
364D1A7-H3L5	4,53

364D1A7-H4L5	4,38
364D1A7-VL- 32V	3,87
Xi175D10	7,24
hz282-11	2,75

**Exemplo 16 - Função de ADCC de anticorpos humanizados exemplares**

[00329] As atividades de ADCC específicas para CLDN18.2 de anticorpos humanizados foram validadas em linhagens de células CHO-CLDN18.1 e CHO-CLDN18.2 como descrito acima. Como mostrado nas Figs. 14A-Fig. 14B, anticorpos humanizados 413H9F8-H1L1 e 364D1A7-H1L1 induziram lise mediada por ADCC de CHO-CLDN18.2, mas não CHO-CLDN18.1. Isso indicava que os anticorpos humanizados retinham a especificidade-alvo de seus anticorpos parentais.

[00330] A eficácia da ADCC de variantes de anticorpo humanizado e anticorpos parentais foram analisadas. Resumidamente, células efetoras FcR-TANK (CD16A-15V) foram misturadas com célula-alvo NCI-N87-CLDN18.2 marcada com CFSE em uma proporção de célula efetora: célula-alvo de 8:1. Células mistas foram cultivadas com anticorpo humanizado por 4 horas. A eficácia da ADCC foi analisada e calculada como descrito acima. Como mostrado nas Figs. 24A-Fig. 24C e Tabela 20, quase todos os anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V testados mostraram atividades de ADCC similares, comparados com seus anticorpos parentais, respectivamente. As atividades de ADCC de anticorpos humanizados foram ainda testadas com PBMCs contra células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2 como descrito acima. Como mostrado nas Figs. 25A-Fig. 25C e na Tabela 21, quase todos

os anticorpos humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V testados mostraram atividades de ADCC comparáveis, comparados com seus anticorpos parentais respectivamente.

Tabela 20. EC<sub>50s</sub> e atividades de ADCC máximas de anticorpos humanizados de anticorpos 413H9F8 e 364D1A7 com células FcR-TANK (CD16A-15V) contra célula de câncer gástrico NCI-N87-CLDN18.2.

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM</b>	<b>% ADCC @ 6,67 nM</b>
413H9F8-VL-32V	0,33	13,9
413H9F8-H1L1	0,47	15,1
413H9F8-H2L1	0,31	14,1
413H9F8-H2L2	0,33	13,7
413H9F8-H1L3	0,37	16,3
413H9F8-H4L3	0,47	15,4
413H9F8-H3L4	0,35	16,0
413H9F8-cp1	0,44	13,3
413H9F8-cp2	0,24	13,2
413H9F8-cp3	0,22	11,1
413H9F8-cp5	0,27	14,1
413H9F8-cp7	0,28	13,3
413H9F8-cp8	0,27	13,1
364D1A7-VL-32V	0,34	15,3
364D1A7-H1L1	0,40	13,5
364D1A7-H3L1	0,41	10,8
364D1A7-H4L1	0,31	9,3
364D1A7-H2L2	0,22	9,4
364D1A7-H1L5	0,26	9,1
364D1A7-H4L5	0,34	12,0

xi175D10	na.	11,9
282A12F3 (T62A)	2,25	14,6
357B8F8-VH-S61I- VL-S32I	1,81	2,3
hIgG1	Aproximadamente 272	-0,1

**Tabela 21. As EC<sub>50s</sub> e atividades de ADCC máximas de anticorpos humanizados de anticorpos 413H9F8 e 364D1A7 com PBMCs contra célula de câncer gástrico NUGC4-CHO18.2.**

<b>Anticorpo</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM</b>	<b>% de citotoxicidade específica @ 6,67 nM</b>
413H9F8-VL-S32V	7,69	31,4
413H9F8-H1L1	8,98	27,0
413H9F8-H2L1	5,97	34,3
413H9F8-H2L2	6,14	33,2
413H9F8-H1L3	4,38	34,6
413H9F8-H4L3	7,01	27,8
413H9F8-H3L4	6,09	28,7
413H9F8-cp1	7,18	31,5
413H9F8-cp2	5,30	32,0
413H9F8-cp3	5,86	30,5
413H9F8-cp5	7,75	29,6
413H9F8-cp7	6,68	29,7
413H9F8-cp8	8,85	27,7
364D1A7-VL-32V	6,36	26,6
364D1A7-H1L1	13,30	26,7
364D1A7-H3L1	11,27	26,2

364D1A7-H4L1	7,58	26,4
364D1A7-H2L2	9,69	26,6
364D1A7-H1L5	8,17	27,5
364D1A7-H4L5	6,40	26,4
357B8F8-VH-S61I-VL-S32I	4,87	19,6
282A12F3 (T62A)	9,52*	21,0
xil75D10	9,21	16,8
hIgG1	na,	-0,8

\*Dados de 1 doador. Outros dados são médias de 3 doadores

**Exemplo 17 atividades de ADCC de variantes de Fc de anticorpos humanizados anti-CLDN18.2.**

[00331] Há 4 alótipos principais de IgG1 humana, incluindo G1m1 (D356/L358), G1m-1 (E356/M358), G1m3 (R214) e G1m17 (K214), que diferem em sua cadeia pesada. Os alótipos são herdados de uma forma Mendeliana codominante, e vários conjuntos de combinações são encontrados em populações africanas, brancas e mongolóides (PMID: 25368619, 26685205). Anticorpos anti-CLDN18.2 que são incluídos nos estudos possuem variantes de Fc com D356/L358 ou E356/M358. Por exemplo, o anticorpo de referência Xil75D10 possui uma variante de Fc com D356/L358. É perceptível que anticorpos com variantes de Fc de D356/L358 e E356/M358 possuem atividades de ADCC similares (dados não mostrados). Um sufixo ao nome "DL" foi adicionado para indicar anticorpos com D356/L358 na Fc, enquanto para aqueles da variante E356/M358, nenhum sufixo ao nome específico foi adicionado. Várias abordagens para a modificação por engenharia genética de Fc, incluindo mutações S239D/I332E e F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, foram desenvolvidas para

aumentar as funções efetoras de anticorpos (PMID: 29070978).

[00332] Anticorpos anti-CLDN18.2 com variantes de Fc S239D/I332E ou F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L foram gerados para aumentar suas funções efetoras. A sufixo ao nome "V2" foi adicionado para anticorpos com variante de Fc S239D/I332E, e um sufixo ao nome "MG" foi adicionado para anticorpos com variante de Fc F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L.

[00333] Os efeitos de ADCC de anticorpos anti-CLDN18.2 com diferentes variantes de Fc foram avaliados em linhagens de células CHO-CLDN18.2 como descrito acima. Resumidamente, células efetoras FcR-TANK (CD16A-15V) foram misturadas com célula-alvo CHO-CLDN18.2 marcada com CFSE em uma proporção de célula efetora: célula-alvo de 4:1. Células mistas foram cultivadas com anticorpo por 4 horas. O efeito de ADCC foi analisado e calculado como descrito acima. Como mostrado na Fig. 31 e na Tabela 22, tanto 413H9F8-cp2-V2-DL quanto 413H9F8-cp2-MG-DL mostraram atividades de ADCC aumentadas, comparados com seus anticorpos parentais 413H9F8-cp2.

**Tabela 22. Atividades de ADCC de variantes de 413H9F8-cp2 com células FcR-TANK (CD16A-15V) contra células CHO-CLDN18.2.**

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM</b>
413H9F8-cp2	0,0080
413H9F8-cp2-V2-DL	0,0010
413H9F8-cp2-MG-DL	0,0024
hIgG1	NA.

NA. não aplicável

[00334] As atividades de ADCC de anticorpos humanizados foram ainda testadas com PBMCs contra células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2 como descrito acima. Anticorpos

humanizados 413H9F8-cp2 e 413H9F8-H2L2 com variantes de Fc diferentes foram analisados quanto às suas habilidades para induzir ADCC com PBMCs humanas contra células NUGC4-CLDN18.2 em uma proporção de célula efetora: célula-alvo de 40:1. As células foram cultivadas por 5 horas. São gerados dados de PBMCs derivadas de um doador saudável. Cada ponto de dado representa o valor médio de duplicatas. Como mostrado na Fig. 32 e na Tabela 23, tanto a variante "V2" quanto a variante "MG" de 413H9F8-H2L2 e 413H9F8-cp2 mostraram atividades de ADCC aumentadas, comparados com seus anticorpos parentais respectivamente.

**Tabela 23. Atividades de ADCC de variantes de 413H9F8-cp2 e 413H9F8-H2L2 com PBMCs humanas contra a linhagem de células de câncer gástrico NUGC4-CLDN18.2.**

<b>Anticorpos</b>	<b>EC<sub>50</sub>, nM</b>
413H9F8-cp2	0,0492
413H9F8-cp2-V2-DL	0,0146
413H9F8-cp2-MG-DL	0,0175
413H9F8-H2L2	0,480
413H9F8-H2L2-V2-DL	0,0148
413H9F8-H2L2-MG-DL	0,0046
hIgG1	NA.

NA. não aplicável

**Exemplo 18 - Atividades de CDC de anticorpos selecionados humanizados**

[00335] As atividades de CDC de variantes de anticorpo humanizado foram analisadas para comparar sua função de CDC com anticorpos parentais como descrito acima. Como mostrado na Fig. 26A-Fig. 26B e na Tabela 24, quase todos os clones humanizados 413H9F8-VL-S32V e 364D1A7-VL-S32V testados

mostraram atividades de CDC similares, comparados com seus anticorpos parentais respectivamente.

**Tabela 24. EC<sub>50s</sub> de clones humanizados 413H9F8 e 364D1A7 selecionados com CDC induzida por soro humano contra células CHO-CHO18.2.**

<b>Anticorpo</b>	<b>CDC, EC<sub>50</sub>, nM</b>
413H9F8-VL-S32V	0,76
413H9F8-H1L1	0,78
413H9F8-H2L1	1,06
413H9F8-H2L2	0,84
413H9F8-H1L3	1,07
413H9F8-cp1	1,66
413H9F8-cp2	1,13
364D1A7-VL-S32V	1,49
364D1A7-H1L1	1,48
364D1A7-H3L1	1,28
xi175D10	2,26
xi-282 (T62A)	10,43

**Exemplo 19 Internalização de anticorpos anti-CLDN18.2 por células tumorais.**

[00336] A internalização de anticorpo por células tumorais foi determinada indiretamente por detecção de retenção na superfície celular de anticorpo após incubação a 37°C para induzir internalização de anticorpo. Resumidamente, células NUGC4-CLDN18.2 e NCI-N87-CLDN18.2 foram coletadas e lavadas com tampão de lavagem (PBS com FBS 1%), e ajustadas para  $1 \times 10^5$  célula /50 µl. Os anticorpos foram diluídos até 20 µg/ml, 50 µl de anticorpos diluídos foram misturados com as células em uma proporção de volume de 1:1, seguido por incubação em banho gelado por 30 min. As

células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem pré-resfriamento e ressuspensas com 800 µl de tampão de lavagem pré-resfriamento. Cem µl de suspensão de células foram adicionados na placa de 96 poços em pontos do tempo diferentes e incubados a 37°C. Duzentos µl de tampão de lavagem pré-resfriamento foram adicionados para interromper a condição de temperatura de endocitose de todas as amostras. Amostras incubadas em banho gelado foram definidas como controle que tinha internalização ausente ou mínima. Após lavagem uma vez, 100 µl/poço do 2º anticorpo (AF647 - Fc γ anti-IgG humana de cabra, Jackson, #109-606-170, diluição de 1:800) foram adicionados e incubados em banho gelado por 30 min. As células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem pré-resfriamento e ressuspensas com 200 µl de tampão de lavagem pré-resfriamento, e analisadas por citometria de fluxo (BD FACS Celesta).

[00337] % de internalização de anticorpos =  $[\text{MFI (incubadas em banho gelado)} - \text{MFI (incubadas a } 37^{\circ}\text{C por um tempo diferente)}] / \text{MFI (incubadas em banho gelado)} \times 100\%$ .

[00338] Como mostrado na Fig. 33 A, Xi175D10-V2 e 282A12F3 (incluindo variantes Xi282A12F3(T62A)-V2-DL, hz282-11-V2 e hz282-15-V2) foram rapidamente internalizados por células NUGC4-CLDN18.2, e mais do que 80% dos anticorpos foram internalizados após incubação a 37°C por 2 horas. Cerca de 50% de Xi350G12E1-V2-DL e Xi325E8C80V2-DL foram internalizados por células NUGC4-CLDN18.2 após incubação a 37°C por 2 horas. Foi perceptível que menos de 15% de 413H9F8-VL-S32V-V2-DL e Xi408B9D4-V2-DL, Xi417H3B1-V2-DL, Xi328G2C4-V2-DL e Xi325F12H3-V2-DL foram internalizados por células NUGC4-CLDN18.2 após incubação a 37°C por 2 horas.

Células NCI-N87-CLDN18.2 também foram empregadas para o ensaio de internalização (Fig. 33 B). Especificamente, mais do que 50% de Xi175D10-V2, 282A12F3 (incluindo variantes Xi282A12F3(T62A)-V2-DL, hz282-11-V2 e hz282-15-V2), xi350G12E1-V2-DL e Xi325E8C80V2-DL foram internalizados por células NCI-N87-CLDN18.2 após incubação a 37°C por 2 horas. Menos do que 30% de 413H9F8-VL-S32V-V2-DL, Xi408B9D4-V2-DL, Xi417H3B1-V2-DL, Xi328G2C4-V2-DL e Xi325F12H3-V2-DL foram internalizados por células NCI-N87-CLDN18.2 após incubação a 37°C por 2 horas.

[00339] Coletivamente, o engajamento de 282A12F3 à CLDN18.2 superexpressa em linhagens de células de câncer gástrico leva a um nível elevado de internalização do anticorpo, enquanto os anticorpos 413H9F8-VL-S32V-V2-DL, Xi408B9D4-V2-DL, Xi417H3B1-V2-DL, Xi328G2C4-V2-DL e Xi325F12H3-V2-DL só desencadeiam internalização de anticorpo mínima a leve, e os anticorpos Xi175D10-V2, Xi325E8C80V2-DL e xi350G12E1-V2-DL induzem um nível de internalização médio a elevado.

#### **Exemplo 20 - Conjugação anticorpo-fármaco**

[00340] Anticorpos 175D10 *naked* (xi175D10), 282A12F3 (T62A) e anticorpo IgG1 humana de controle de isótipo foram conjugados a mc-vc-PAB-MMAE, um derivado de monometil auristatina E (MMAE) que compreende um ligante clivável de valina-citrulina (vc) (Fig. 27). Resumidamente, os anticorpos foram descongelados em um refrigerador a 4°C por mais de 4 horas e dialisados contra tampão de conjugação (25 mM de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 25 mM de NaCl, 1 mM de DTPA, pH 7,4) a 4°C de um dia para o outro. Os anticorpos foram reduzidos por adição de solução de trabalho de TCEP recém preparada (5 mM de TCEP

em tampão de conjugação de cisteína-maleimida, TCEP-HCl), incubação em um banho-maria a 25°C por 2 horas. O anticorpo foi conjugado com solução de trabalho de mc-vc-PAB-MMAE (XDCEplorer) recém preparada em DMSO (10 mM) em uma proporção de 6 na presença de 10% de Solvente Orgânico v/v (DMSO), incubação da mistura em um banho-maria a 25°C por 2 horas. A conjugação de anticorpo-fármaco foi dialisada contra tampão de diálise de L-Histidina (20 mM de L-Histidina, pH 5,5) a 4°C de um dia para o outro, com uma troca de tampão de diálise após 4 horas. O produto final foi extraído e filtrado com um filtro de 0,2 µm, e a qualidade foi analisada por HIC-HPLC. O resultado de HIC-HPLC mostrou que o valor da proporção de fármaco-para-anticorpo (DAR) de todos os conjugados variou de 3,5 a 4,0 (Tabela 25). Com o aumento na proporção molar de TCEP, o valor de DAR de ADC também aumentou.

**Tabela 25. Valor de DAR de ADCs.**

<b>ADC</b>	<b>Proporção molar de TCEP</b>	<b>DAR<sub>0</sub> (%)</b>	<b>DAR<sub>2</sub> (%)</b>	<b>DAR<sub>4</sub> (%)</b>	<b>DAR<sub>6</sub> (%)</b>	<b>DAR<sub>8</sub> (%)</b>	<b>DAR média (%)</b>
Controle de IgG1 humana	2,1	6,76	31,75	43,6	15,05	2,84	3,51
	2,3	4,65	29,74	44,6	17,46	3,55	3,71
	2,5	3,7	26,43	45,34	19,52	5,01	3,91
282A12F3	2,1	4,61	31,93	45,89	15,72	1,85	3,57
	2,3	3,77	30,1	46,04	17,69	2,4	3,70
	2,5	2,79	25,22	47,96	20,33	3,69	3,94
Xi175D10	2,1	2,28	28,98	50,77	16,22	1,74	3,72
	2,3	1,62	25,5	53,39	17,79	1,69	3,85
	2,5	1,28	21,34	55,29	19,4	2,69	4,02

**Exemplo 21 - Atividades de morte celular de ADCs em células HEK293-CLDN18.2**

[00341] A citotoxicidade de xi-175D10-vcMMAE, 282A12F3(T62A)-vcMMAE e huIgG1-vcMMAE (com 3 DARs diferentes), bem como anticorpos *naked* correspondentes, foi testada na linhagem de células HEK293 que superexpressam CLDN18.2 (HEK293-CLDN18.2). Resumidamente, células HEK293-CLDN18.2 foram semeadas em uma placa de 96 poços e desenvolvidas de um dia para o outro a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. Anticorpos *naked* e ADCs foram preparados na concentração 4X (60 µg/ml, 400 nM) e foram diluídos serialmente 5 vezes em meio de crescimento de células. Cem µl da diluição primária foram misturados com 100 µl de meio para fazer uma concentração 2X. Cinquenta µl de cada diluição complexa foram adicionados às células em triplicata. As células foram incubadas por 5 dias a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%. A citotoxicidade foi determinada pelo kit "CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay" (Promega). Cem µl/poço de reagente CellTiter Glo foram adicionados para leitura da viabilidade celular, incubados em temperatura ambiente na agitadora por 10 minutos, e a luminescência registrada em Envision.

[00342] Como mostrado na Fig. 28A-Fig. 28B, a viabilidade celular não foi afetada por tratamento com anticorpos *naked*, enquanto a viabilidade celular foi diminuída de uma forma concentração-dependente com tratamento com ADCs 282A12F3 (T62A)-vcMMAE e xi175D10-vcMMAE. Além disso, 282A12F3 (T62A)-vcMMAE foi mais eficiente na indução de morte celular, comparado com xi175D10-vcMMAE. ADCs 282A12F3 (T62A)-vcMMAE e xi175D10-vcMMAE não afetaram a viabilidade da célula HEK293, que é CLDN18.2-negativa. Isso indica que ADCs

282A12F3 (T62A)-vcMMAE e xi175D10-vcMMAE inibem especificamente a viabilidade de células CLDN18.2-positivas.

**Exemplo 22- Atividades de morte celular de ADCs em células NCI-N87-CLDN18.2**

[00343] Duas linhagens de células de câncer gástrico que superexpressam CLDN18.2, células NCI-N87-CLDN18.2 e NUGC4-CLDN18.2, foram usadas para testar as atividades de morte celular de ADCs como descrito acima. Como mostrado na Fig. 29A-Fig. 29B, a viabilidade celular foi diminuída de uma forma concentração-dependente com o tratamento com ADCs 282A12F3 (T62A)-vcMMAE e xi175D10-vcMMAE. Além disso, 282A12 (T62A)-vcMMAE ADCs induziu morte celular maior do que xi175D10-vcMMAE. Células NUGC4-CLDN18.2 foram menos sensíveis à morte celular induzida por ADCs, comparada com NCI-N87-CLDN18.2.

**Exemplo 23 - Atividades de morte celular de ADCs em células que são menos sensíveis à ADCC**

[00344] A linhagem de células de câncer pancreático PANC-1-CLDN18.2 que foi transfectada estavelmente com CLDN18.2 e demonstrou ser menos sensível à eficácia da ADCC mediada por 282A12F3 quimérico (T62A) (Fig. 30A) foi usada no ensaio de morte celular ADC-dependente. Como mostrado na Fig. 30B, tanto 282A12F3 (T62A)-vcMMAE quanto xi175D10-vcMMAE inibiram a viabilidade de células PANC-1-CLDN18.2 de formas concentração-dependentes, e 282A12F3 (T62A)-vcMMAE foi mais potente do que xi175D10-vcMMAE na indução de morte celular de células PANC-1-CLDN18.2.

[00345] Em resumo, anti-CLDN18.2-ADCs matou linhagens de células que superexpressam CLDN18.2, incluindo HEK293-CLDN18.2, NCI-N87-CLDN18.2 e NUGC4-CLDN18.2. 282A12F3

(T62A)-vcMMAE foi mais potente do que xi175D10-vcMMAE na inibição da viabilidade de linhagens de células testadas. Além disso, foi observado que a proporção de fármaco-anticorpo na faixa entre 3.5 e 4.0 não modula as atividades de morte celular das ADCs (Tabela 26).

Tabela 26. Atividades de morte celular de ADCs CLDN18.2-específicos.

ADC	Linhagens de células CLDN18.2-positivas									Linhagens de células CLDN18.2-negativas	
	HEK293-CLDN18.2			Panc1-CLDN18.2		NCI-N87-CLDN18.2		NUGC4-CLDN18.2		HEK293	
	DAR	IC <sub>50</sub> (nM)	Morte (%) @ 20 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	Morte (%) @ 20 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	Morte (%) @ 20 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	Morte (%) @ 20 nM	IC <sub>50</sub> (nM)	Morte (%) @ 20 nM
282A12F3 (T62A) - vcMMAE	3,57	0,44	95,0	1,5	90,8	10,8	74,4	25,6	45,8	na	1,3
	3,7	0,35	95,4	1,1	92,4	9,0	78,7	21,7	45,3	na	0,8
	3,94	0,38	95,2	1,3	91,2	7,6	79,9	20,1	50,7	na	8,9
xi175D10-vcMMAE	3,72	1,51	93,7	3,3	86,5	23,0	42,6	38,3	35,5	na	9,8
	3,85	1,23	93,3	3,0	87,4	21,4	46,2	39,0	34,8	na	10,5
	4,02	1,41	93,0	3,1	87,5	23,6	39,6	37,6	34,7	na	4,8
hIgG1-vcMMAE	3,51	na	17,2	58,7	14,5	53,6	4,1	181,2	9,9	na	1,8
	3,71	na	13,1	49,2	21,7	49,7	6,7	222,0	14,3	na	2,4
	3,91	na	8,5	55,0	15,0	48,5	6,1	130,8	12,1	na	-1,7

**Exemplo 24 - Eficácias de anticorpos anti-CLDN18.2 no modelo de xenoenxerto derivado de paciente com câncer gástrico humano GA0006 (PDX) em camundongos nude.**

[00346] As eficácias *in vivo* de anticorpos anti-CLDN18.2 foram testadas no modelo de xenoenxerto derivado de paciente (PDX) em camundongos *nude*. GA0006 foi derivado do estômago de um paciente asiático com câncer gástrico com o diagnóstico patológico do tipo adenocarcinoma, multicópias de ERBB2. A expressão elevada de CLDN18.2 em GA0006 foi confirmada por análises IHC e FACS com anticorpos anti-CLDN18.2 (dados não mostrados). Camundongos BALB/c *nude* foram inoculados por via subcutânea com tumores de cerca de 3 mm x 3 mm x 3 mm de tamanho no tornozelo direito. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (8 camundongos por grupo): PBS, isótipo hIgG1 (100 mg/kg), xi175D10-V2, 413H9F8-H2L2-V2-DL e 413H9F8-cp2-V2-DL (50 e 100 mg/kg), quando o tamanho médio do tumor alcançava cerca de 100 mm<sup>3</sup>. O coeficiente de variação para tumor-volume foi de menos do que 40%, que foi calculada pela fórmula:  $CV = SD/MTV \times 100\%$ . O dia da randomização foi registrado como dia 0. O tratamento dos camundongos foi iniciado no dia 0. Os anticorpos foram administrados 3 vezes por semana por 3 semanas com injeções intravenosas e intraperitoneais alternantes. Os tamanhos dos tumores foram monitorados duas vezes por semana.

[00347] Como mostrado na Fig. 34, o tratamento com 50 mg/kg de xi175D10-V2 ou 413H9F8-H2L2-V2-DL retardou o crescimento tumoral, comparado com o grupo de isótipo (100 mg/kg), embora não tenha obtido diferença significativa ( $p > 0,05$ ). O tratamento com 100 mg/kg de xi175D10-V2 e 413H9F8-H2L2-V2-DL inibiu significativamente o crescimento

tumoral, comparado com aqueles tratados com isótipo (100 mg/kg) ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ). Os tratamentos tanto com 50 mg/kg quanto com 100 mg/kg de 413H9F8-cp2-V2-DL inibiram significativamente o crescimento tumoral, comparados com aqueles tratados com isótipo (100 mg/kg) ( $p < 0,0001$ ). O tratamento com 50 mg/kg de 413H9F8-cp2-V2-DL inibiu significativamente o crescimento tumoral, comparado com aqueles tratados com xi175D10-V2 (50 mg/kg) e 413H9F8-H2L2-V2-DL (50 mg/kg) ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ ). O tratamento com 100 mg/kg de 413H9F8-cp2-V2-DL significativamente inibiu o crescimento tumoral, comparado com aqueles tratados com xi175D10-V2 (100 mg/kg) e 413H9F8-H2L2-V2-DL (100 mg/kg) ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ ).

**Exemplo 25 - Eficácias de anticorpos anti-CLDN18.2 em modelos de xenoenxerto em camundongo de câncer pancreático em camundongos Nu/Nu**

[00348] As eficácias *in vivo* de anticorpos anti-CLDN18.2 foram testadas em modelos de xenoenxerto subcutâneo de câncer pancreático em camundongos Nu/Nu. A linhagem de células de câncer pancreático MIA Paca-2 que superexpressam CLDN18.2 (MIA Paca-2-CLDN18.2) foi mantida *in vitro* como uma cultura de monocamada em meio DMEM suplementado com soro bovino fetal 10%, soro de cavalo 2,5%, penicilina/estreptomicina 1%, 5 µg/ml de blasticidina, a 37°C, em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% no ar. Células MIA Paca-2-CLDN18.2 foram subcultivadas rotineiramente duas vezes por semana por tratamento com tripsina-EDTA. Células MIA Paca-2-CLDN18.2 crescendo em fase de crescimento exponencial foram coletadas e contadas para inoculação do tumor. Camundongos Nu/Nu *nude*, fêmeas, de 4-6 semanas, foram inoculados por via subcutânea no flanco

direito com  $5 \times 10^6$  células MIA Paca-2-CLDN18.2 em 0,2 ml de PBS (suplementado com Matrigel, PBS: Matrigel = 1:1) para desenvolvimento do tumor. O tratamento de camundongos Nu/Nu com tumor de Paca-2-CLDN18.2 (10 camundongos por grupo) foi iniciado 3 dias após inoculação do tumor. Anticorpos anti-CLDN18.2 (10 e 40 mg/kg) foram administrados 2 vezes por semana por 5 semanas com injeções intravenosas e intraperitoneais alternantes. Camundongos Nu/Nu com tumor tratados com PBS ou isótipo (hIgG1, 40 mg/kg) foram definidos como controle negativo.

[00349] Camundongos tratados com Xi175D10-V2, 413H9F8-H2L2-V2-DL a 10 e 40 mg/kg mostraram retardo significativo do crescimento tumoral, comparados com camundongos tratados com PBS ou isótipo (40 mg/kg) ( $p < 0,01$ ) (Fig. 35 A-D). Camundongos tratados com 413H9F8-cp2-V2-DL a 40 mg/kg inibiram significativamente o crescimento tumoral, comparados com aqueles tratados com PBS ou isótipo (40 mg/kg) ( $p < 0,01$ ) (Figs. 35A e E). Camundongos tratados com 413H9F8-cp2-V2-DL a 10 mg/kg inibiram o crescimento tumoral, mas não com uma diferença significativa, comparados com aqueles tratados com PBS ou isótipo (40 mg/kg) (Fig. 35 A e E).

**Exemplo 26 Eficácias combinatórias de anticorpos anti-CLDN18.2 e quimioterapia no modelo de xenoenxerto derivado de paciente com câncer gástrico humano GA0006 (PDX)**

[00350] O modelo de camundongos PDX foi estabelecido como descrito acima. O tratamento dos camundongos foi iniciado no dia 0. Camundongos com tumor foram tratados com PBS, EOF (1,25 mg/kg de epirrubicina, 3,25 mg/kg de oxaliplatina e 56,25 mg/kg de 5-fluoruracil), xi175D10-V2 (40 mg/kg) combinado com EOF ou 413H9F8-H2L2-V2-DL (40 mg/kg) combinado

com EOF. EOF foram administrados por via intraperitoneal uma vez por semana. Os anticorpos foram administrados 3 vezes por semana por injeções intravenosas e intraperitoneais alternantes. O tamanho do tumor foi monitorado duas vezes por semana. No total, foram feitas 5 administrações de EOF e 14 tratamentos com anticorpos.

[00351] Como mostrado na Fig. 36, o tratamento com EOF isoladamente ou EOF combinado com xi175D10-V2 ou 413H9F8-H2L2-V2-DL inibiu significativamente o crescimento tumoral, comparado com aqueles tratados com PBS ( $p < 0,01$ ). 413H9F8-H2L2-V2-DL combinado com EOF mostrou efeitos superiores em relação à terapia com EOF isoladamente ( $p < 0,01$ ). No entanto, xi175D10-V2 combinado com EOF não mostrou efeitos melhores, comparado com a terapia com EOF isoladamente ( $p = 0,147$ ). Além disso, a combinação de 413H9F8-H2L2-V2-DL com EOF foi superior à combinação de xi175D10-V2 com EOF ( $p < 0,05$ ).

### Exemplo 27

A Tabela 27 ilustra as sequências da cadeia pesada e da cadeia leve do anticorpo de referência 175D10 (xi175D10).

	SEQUÊNCIA	ID. DE SEQ. N°:
<b>Cadeia pesada de 175D10</b>	MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVR PGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGL EWIGNIYPSDSYTNYNQKFKDKATLTVDKSSS TAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRSWRGNSFDYWG QGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH	98

	EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVM  HEALHNHYTQKSLSLSPGK	
<b>Cadeia  leve de  175D10</b>	MESQTQVLMSELLFWVSGTCGDIVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTD FTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPFTFGSGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH  QGLSSPVTKSFNRGEC	99

[00352] Embora modalidades preferidas da presente revelação tenham sido mostradas e descritas nesse relatório descritivo, será óbvio para aqueles habilitados na técnica que essas modalidades são fornecidas apenas como exemplo. Diversas variações, alterações e substituições ocorrerão agora àqueles habilitados na técnica, sem se afastar da revelação. Deve ser subentendido que várias alternativas às modalidades da revelação descritas nesse relatório descritivo podem ser empregadas na prática da revelação. Deseja-se que as reivindicações seguintes definam o escopo da revelação e que os métodos e estruturas dentro do escopo dessas reivindicações e seus equivalentes sejam por elas cobertas.

**REIVINDICAÇÕES**

1. Anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2), **caracterizado** por compreender a metade da concentração efetiva máxima (EC50) que é menor do que uma EC50 de anticorpo de referência 175D10, em que o anticorpo de referência 175D10 compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99.

2. Anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2), **caracterizado** por compreender pelo menos uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução.

3. Anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2), **caracterizado** por compreender pelo menos uma mutação em uma região Fc que confere citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC) aumentada, em que a ADCC aumentada é comparada com o anticorpo de referência 175D10 que compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99.

4. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a EC50 do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 5 nM ou menor.

5. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a EC50 do anticorpo anti-CLDN18.2 é cerca de 5 nM, cerca de 4 nM, cerca de 3 nM, cerca de 2 nM, cerca de 1 nM, cerca de 0,5 nM, ou menor.

6. Anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2), **caracterizado** por compreender uma afinidade de ligação maior para CLDN18.2 em relação a uma afinidade de ligação do

anticorpo de referência 175D10, em que o anticorpo de referência 175D10 compreende uma sequência da cadeia pesada (HC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 98 e uma sequência da cadeia leve (LC) apresentada no ID. DE SEQ. N°: 99.

7. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região variável da cadeia leve (VL), em que a região VH compreende:

sequência CDR1 GFSLTSYX<sub>1</sub>VX<sub>2</sub>;

em que X<sub>1</sub> é selecionado de N ou G; e X<sub>2</sub> é selecionado de Y ou H;

sequência CDR2 VIWX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>GX<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>YX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S;

em que X<sub>3</sub> é selecionado de N ou P; X<sub>4</sub> é selecionado de T ou G; X<sub>5</sub> é selecionado de A ou N; X<sub>6</sub> é selecionado de R ou N; X<sub>7</sub> é selecionado de N, Q ou E; X<sub>8</sub> é selecionado de S ou I; X<sub>9</sub> é selecionado de T ou A; e X<sub>10</sub> é selecionado de K ou M; e

sequência CDR3 DX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>X<sub>19</sub>X<sub>20</sub>;

em que X<sub>11</sub> é selecionado de S ou R; X<sub>12</sub> é selecionado de A ou R; X<sub>13</sub> é selecionado de M ou L; X<sub>14</sub> é selecionado de P ou A; X<sub>15</sub> é selecionado de A ou M; X<sub>16</sub> é selecionado de I ou D; X<sub>17</sub> é selecionado de P ou Y; X<sub>18</sub> está presente ou ausente e, se presente, é F; X<sub>19</sub> está presente ou ausente e, se presente, é A; e X<sub>20</sub> está presente ou ausente e, se presente, é Y.

8. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende

sequência CDR1 X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>SFGMH;

em que  $X_{21}$  está presente ou ausente e, se presente, é G;  $X_{22}$  está presente ou ausente e, se presente, é F;  $X_{23}$  está presente ou ausente e, se presente, é T;  $X_{24}$  está presente ou ausente e, se presente, é F; e  $X_{25}$  está presente ou ausente e, se presente, é S;

sequência CDR2 YISSGSX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>IYYX<sub>28</sub>DX<sub>29</sub>X<sub>30</sub>KG;

em que  $X_{26}$  é selecionado de S ou G;  $X_{27}$  é selecionado de P ou S;  $X_{28}$  é selecionado de V ou A;  $X_{29}$  é selecionado de K ou T; e  $X_{30}$  é selecionado de L ou V; e

sequência CDR3 AX<sub>31</sub>X<sub>32</sub>X<sub>33</sub>X<sub>34</sub>X<sub>35</sub>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub>X<sub>41</sub>;

em que  $X_{31}$  é selecionado de G ou T;  $X_{32}$  é selecionado de Y ou S;  $X_{33}$  é selecionado de A ou Y;  $X_{34}$  é selecionado de V ou Y;  $X_{35}$  é selecionado de R ou Y;  $X_{36}$  é selecionado de N ou G;  $X_{37}$  é selecionado de A ou N;  $X_{38}$  é selecionado de L ou A;  $X_{39}$  é selecionado de D ou L;  $X_{40}$  é selecionado de Y ou E; e  $X_{41}$  está presente ou ausente e, se presente, é Y.

9. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 1, sequência CDR2 VIWNTGATRYX<sub>7</sub>SX<sub>9</sub>LKS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 3, em que  $X_7$  é selecionado de N, Q ou E; e  $X_9$  é selecionado de T ou A.

10. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 13, sequência CDR2 VIWPGGNTNYX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>ALMS, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N°: 15, em que  $X_7$  é selecionado de N ou E; e  $X_8$  é selecionado de S ou I.

11. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que a

região VH compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 1, 7, 10 ou 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 2, 4, 5, 6, 8, 11, 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 3, 9, 12 ou 15.

12. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 1; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 2, 4, 5 ou 6; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 3.

13. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 13; sequência CDR2 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 14, 16 ou 17; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 15.

14. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 7, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 8, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 9.

15. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que a região VH compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 10, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 11, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 12.

16. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, **caracterizado** pelo fato de que a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 18, 21, 24-28, 31-35, 38 ou 39; sequência CDR2

selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 19, 22, 29 ou 36; e sequência CDR3 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 20, 23, 30 ou 37.

17. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, **caracterizado** pelo fato de que a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 21 ou 24-27; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 22; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 23.

18. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, **caracterizado** pelo fato de que a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 28 ou 31-34; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 29; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 30.

19. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, **caracterizado** pelo fato de que a região VL compreende sequência CDR1 selecionada dos IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 35, 38 ou 39; sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 36; e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 37.

20. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, **caracterizado** pelo fato de que a região VL compreende sequência CDR1 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 18, sequência CDR2 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 19, e sequência CDR3 que consiste no ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 20.

21. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 é um anticorpo de comprimento total.

22. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma

das reivindicações 1-20, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 é um fragmento de ligação.

23. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um Fab' monovalente, um Fab2 divalente, um fragmento variável de cadeia única (scFv), um *diabody*, um *minibody*, um *nanobody*, um anticorpo de domínio único (sdAb), ou um anticorpo de camelídeo ou fragmento de ligação deste.

24. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste, um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste, um anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação deste, ou um anticorpo biespecífico ou fragmento de ligação deste.

25. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-24, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma mutação em um sítio de modificação pós-tradução.

26. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido 60, 61 ou 62 de uma região VH, e em que as posições de aminoácidos correspondem à posição 60, 61 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40.

27. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 62 do ID. DE SEQ. N°: 40.

28. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a

reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido 60 ou 61 do ID. DE SEQ. Nº: 57.

29. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26-28, **caracterizado** pelo fato de que a mutação no resíduo de aminoácido N60 é para glutamina ou ácido glutâmico.

30. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26-28, **caracterizado** pelo fato de que a mutação no resíduo de aminoácido S61 é para isoleucina.

31. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26-28, **caracterizado** pelo fato de que a mutação no resíduo de aminoácido T62 é para alanina.

32. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a mutação está em uma posição de aminoácido 31 ou 32 de uma região VL, e em que as posições de aminoácidos correspondem à posição 31 ou 32 do ID. DE SEQ. Nº: 46, 52 ou 60.

33. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que a mutação está na posição de aminoácido 31 ou 32 do ID. DE SEQ. Nº: 46, 52 ou 60.

34. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **caracterizado** pelo fato de que a mutação no resíduo de aminoácido N31 é para ácido aspártico ou ácido glutâmico.

35. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **caracterizado** pelo fato de que a mutação no resíduo de aminoácido S32 é para leucina, valina ou isoleucina.

36. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 25-35, **caracterizado** pelo fato de que a mutação aumenta a afinidade de ligação do anticorpo anti-CLDN18.2 modificado em relação para o anticorpo de referência 175D10.

37. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste.

38. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 40-43 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 44.

39. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 45 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 46-50.

40. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 51 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou

100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 52-56.

41. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 37, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 57-59 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 60-62.

42. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 37-41, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo quimérico ou fragmento de ligação deste compreende uma região CH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 63 e uma região CL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N<sup>o</sup>: 64.

43. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-36, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste.

44. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 65-68 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 69-73.

45. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 74-76 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 77-80.

46. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 81-84 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 85-88.

47. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 43, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo humanizado ou fragmento de ligação deste compreende uma região VH que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 89-92 e uma região VL que compreende pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência para os IDS. DE SEQ. N<sup>os</sup>: 93-97.

48. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-47, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgM.

49. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-47, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG2.

50. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-47, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um arcabouço de IgG1.

51. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-50, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende uma ou mais mutações na região FC.

52. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que as uma ou mais mutações compreendem uma mutação na posição de aminoácido S239, posição de aminoácido I332, posição de aminoácido F243, posição de aminoácido R292, posição de aminoácido Y300, posição de aminoácido V305, posição de aminoácido P396 ou uma combinação destas.

53. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 51 ou 52, **caracterizado** pelo fato de que uma ou mais mutações na região FC conferem ADCC aumentada ao anticorpo de referência 175D10.

54. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 possui uma atividade de citotoxicidade complemento-dependente (CDC), comparado com o anticorpo de referência 175D10.

55. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-54, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 é ainda conjugado a uma carga útil.

56. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que a carga útil é uma auristatina ou um derivado desta.

57. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a

reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o derivado de auristatina é monometil auristatina E (MMAE).

58. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 56, **caracterizado** pelo fato de que o derivado de auristatina é monometil auristatina F (MMAF).

59. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55-58, **caracterizado** pelo fato de que a proporção de fármaco-para-anticorpo (DAR) é cerca de 2, cerca de 3, ou cerca de 4.

60. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-59, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compartilha um epitopo de ligação com o anticorpo de referência 175D10.

61. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-60, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 possui uma atividade de ligação cruzada com proteína CLDN18.2 de camundongo e de *Cynomolgus*.

62. Anticorpo anti-Claudina 18.2 (anti-CLDN18.2), **caracterizado** por se ligar especificamente a uma isoforma de CLDN18.2.

63. Anticorpo anti-CLDN18.2, de acordo com a reivindicação 62, **caracterizado** pelo fato de que a isoforma de CLDN18.2 é uma isoforma expressa na linhagem de células SNU620.

64. Polímero de ácido nucleico **caracterizado** por codificar um anticorpo anti-CLDN18.2 conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-63.

65. Vetor **caracterizado** por compreender um polímero de ácido nucleico conforme definido na reivindicação 64.

66. Composição farmacêutica **caracterizada** por

compreender:

um anticorpo anti-CLDN18.2, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-63; e

um excipiente farmacologicamente aceitável.

67. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 66, **caracterizada** pelo fato de que a composição farmacêutica é formulada para administração sistêmica.

68. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 66 ou 67, **caracterizada** pelo fato de que a composição farmacêutica é formulada para administração parenteral.

69. Método de tratamento de um indivíduo que possui um câncer que é distinguido por uma superexpressão de proteína CLDN18.2, **caracterizado** por compreender:

administração ao indivíduo de um anticorpo anti-CLDN18.2, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-63 ou uma composição farmacêutica das reivindicações 66-68 tratando, dessa forma, o câncer no indivíduo.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer gastrointestinal.

71. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrointestinal é um câncer gástrico.

72. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrointestinal é um câncer pancreático.

73. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrointestinal é um

câncer esofágico ou colangiocarcinoma.

74. Método, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é câncer de pulmão ou câncer ovariano.

75. Método, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizado** pelo fato de que ainda compreende a administração ao indivíduo de um agente terapêutico adicional.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional compreende um agente quimioterápico, um agente imunoterápico, um agente terapêutico direcionado, um agente terapêutico à base de hormônio, um agente terapêutico à base de célula-tronco ou radiação.

77. Método, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são administrados simultaneamente.

78. Método, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são administrados sequencialmente.

79. Método, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é administrado antes do anticorpo anti-CLDN18.2.

80. Método, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é administrado depois da administração do anticorpo anti-CLDN18.2.

81. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 75-80, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional e o anticorpo anti-CLDN18.2 são formulados como dosagens separadas.

82. Método de indução de efeito de morte celular, **caracterizado** por compreender:

o contato de diversas células com um anticorpo anti-CLDN18.2 que compreende uma carga útil por um tempo suficiente para internalizar o anticorpo anti-CLDN18.2 e, dessa forma, induzir o efeito de morte celular.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo anti-CLDN18.2 compreende um anticorpo anti-CLDN18.2, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-54.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizado** pelo fato de que a carga útil compreende um maitansinoide, uma auristatina, um taxoide, uma caliqueamicina, uma duocarmicina, uma amatoxina, ou um derivado destes.

85. Método, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizado** pelo fato de que a carga útil compreende uma auristatina ou um derivado desta.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, **caracterizado** pelo fato de que a carga útil é monometil auristatina E (MMAE).

87. Método, de acordo com a reivindicação 85, **caracterizado** pelo fato de que a carga útil é monometil auristatina F (MMAF).

88. Método, de acordo com a reivindicação 82, **caracterizado** pelo fato de que a célula é uma célula de câncer.

89. Método, de acordo com a reivindicação 88, **caracterizado** pelo fato de que a célula é de um câncer gastrintestinal.

90. Método, de acordo com a reivindicação 89, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrintestinal é um câncer gástrico.

91. Método, de acordo com a reivindicação 89, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrintestinal é um câncer pancreático.

92. Método, de acordo com a reivindicação 89, **caracterizado** pelo fato de que o câncer gastrintestinal é um câncer esofágico ou colangiocarcinoma.

93. Método, de acordo com a reivindicação 88, **caracterizado** pelo fato de que a célula é de um câncer de pulmão ou um câncer ovariano.

94. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82-93, **caracterizado** pelo fato de que o método é um método *in vitro*.

95. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 82-93, **caracterizado** pelo fato de que o método é um método *in vivo*.

96. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é um humano.

97. Kit **caracterizado** por compreender um anticorpo anti-CLDN18.2, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1-63, um vetor conforme definido na reivindicação 65, ou uma composição farmacêutica conforme definido em qualquer das reivindicações 66-68.

FIG.1

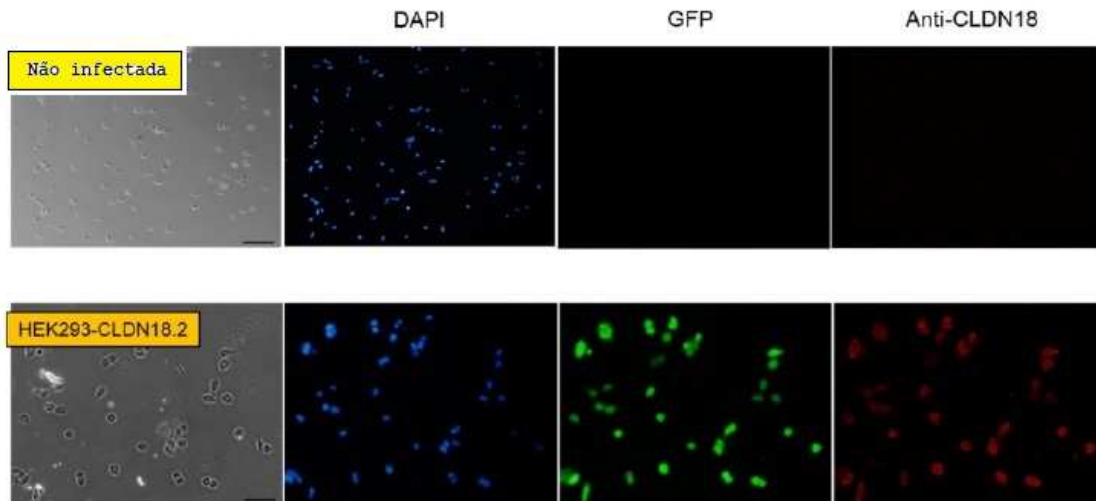


FIG. 2

```

atgtccacca ccacatgcc a gttgggtggcg ttctctctgt ccatcctggg gctggccggc 60
tgcategcgg ccaccgggat ggacatgtgg agcaaccagg acctgtacga caaccccgtc 120
acctccgtgt tccagtacga agggctctgg aggagctgcg tgaggcagag ttcaggett c 180
accgaatgca ggccctattt caccatcctg ggacttccag ccatgctgca ggcagtgcga 240
ggcctgatga tegttaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcttggtatc catctttgcc 300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcc aagccaacat gacactgacc 360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggctct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg 480
atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca ttgggtgceg ctctgttcgt gggctgggtc 540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tegcctgceg gggcctggca 600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgcttac 660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc ttgggtcca acacaaaaa caagaagata 720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat 780
gtgtaa 786

```

FIG. 3

```

atggagacag acacactect gctatgggta ctgetgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc      120
actccagtgt ggtggaatte tgcagatggc cgcattggacc agtggagcac ccaagacttg      180
tacaacaacc ccgtaacagc tgttttcaac taccaggggc tgtggcgctc ctgtgtccga      240
gagagctctg gcttcaccga gtgccggggc tacttcaccc tgctggggct gccagccatg      300
ctgcaggcag tgcgagcggc catccagcac agtggcgggc gctcagaggag ggccccgaaca      360
aaaactcacc tcagaagagg atctgaatag                                         390

```

FIG. 4A

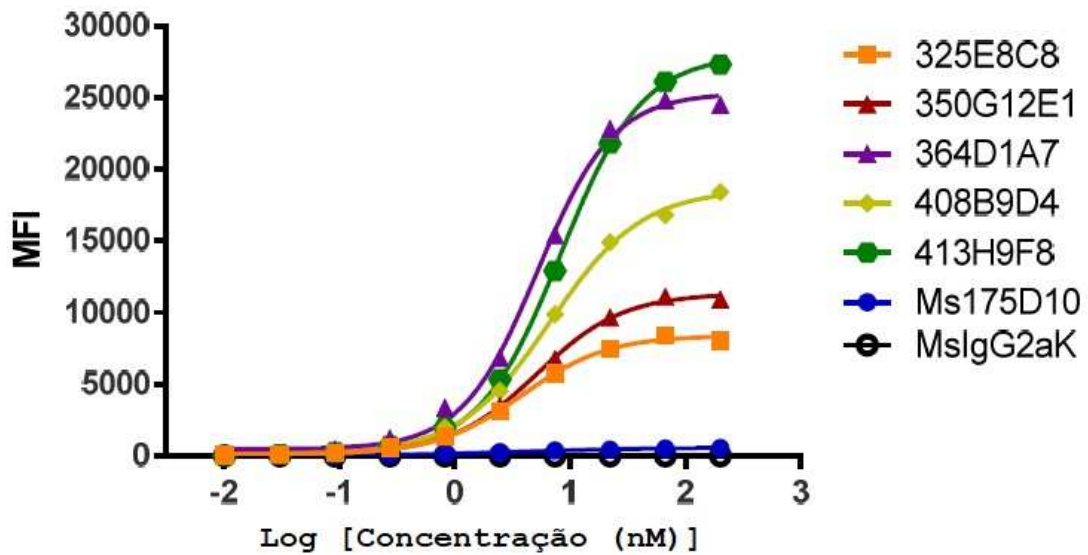


FIG. 4B

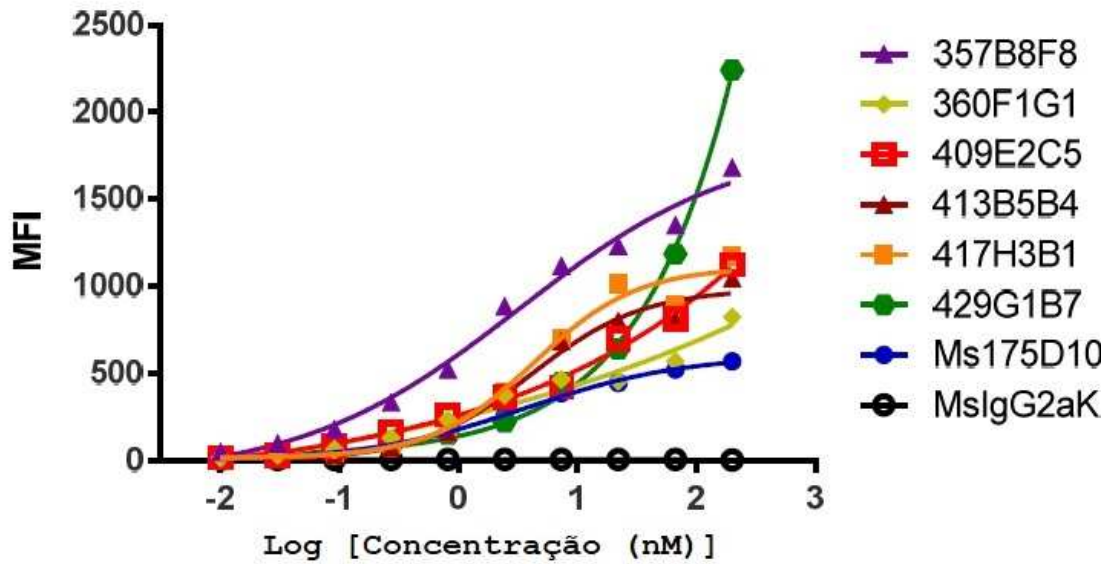


FIG. 4C

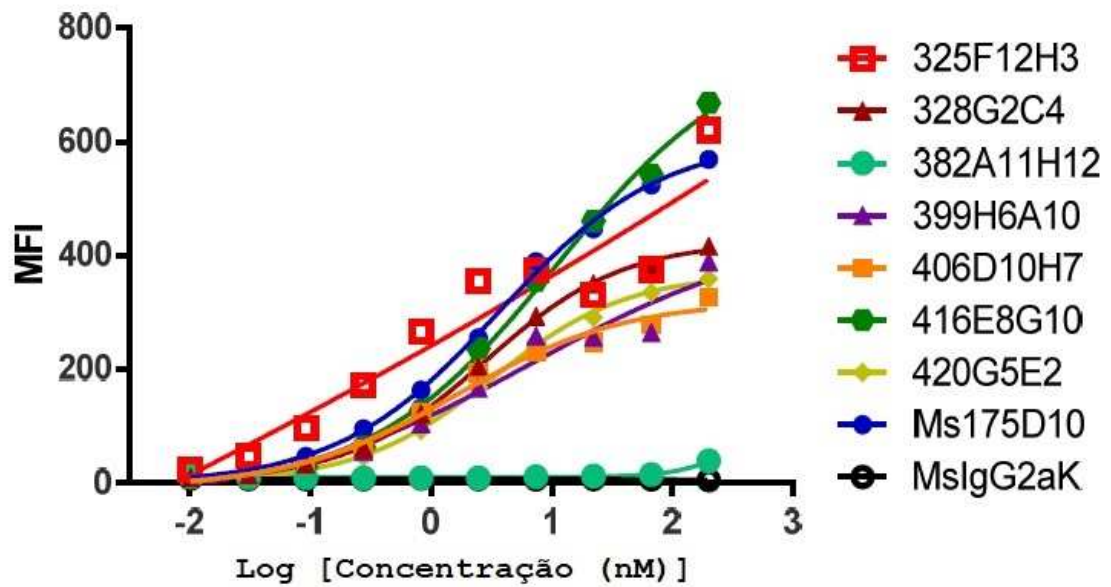


FIG. 5A

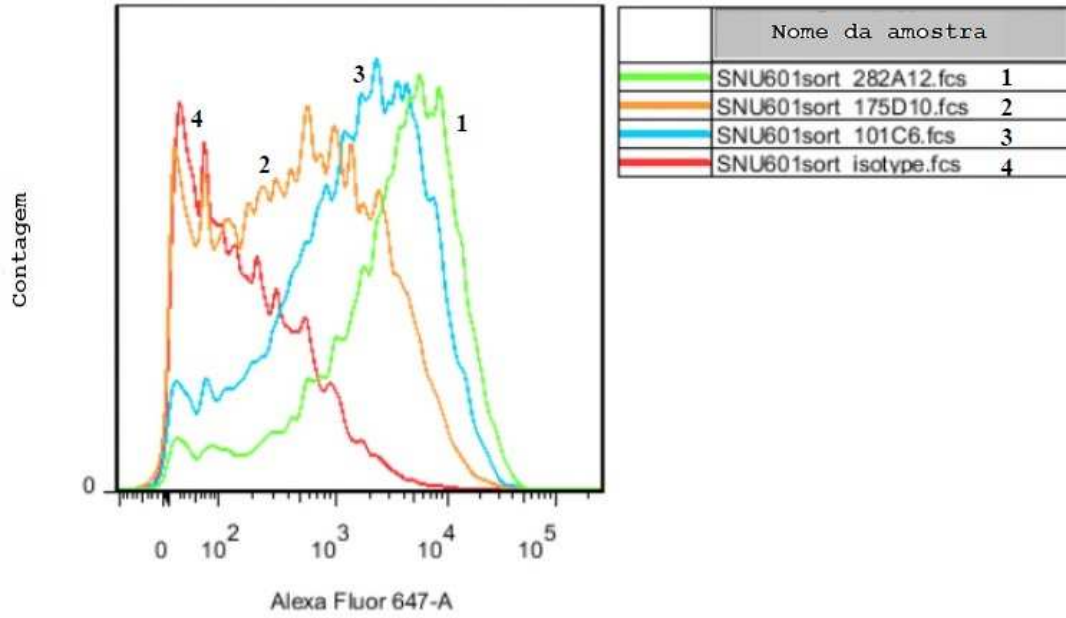


FIG. 5B

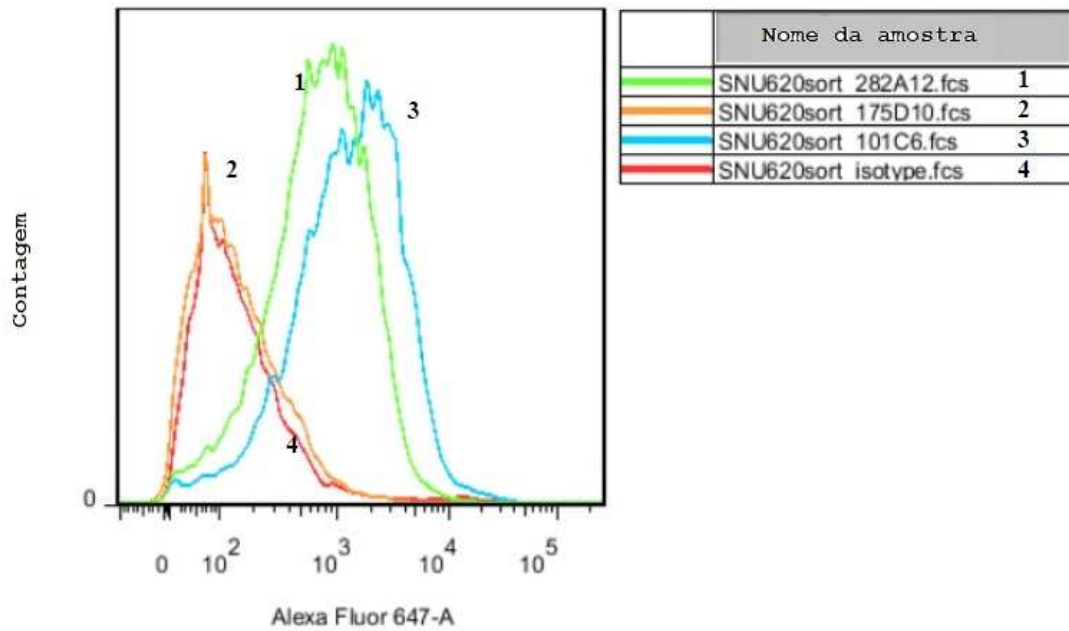


FIG. 6A CHO-CLDN18.1

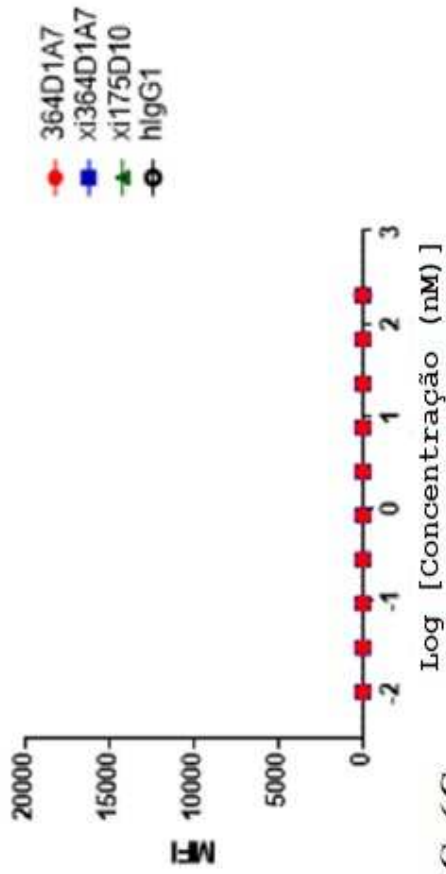


FIG. 6B CHO-CLDN18.2

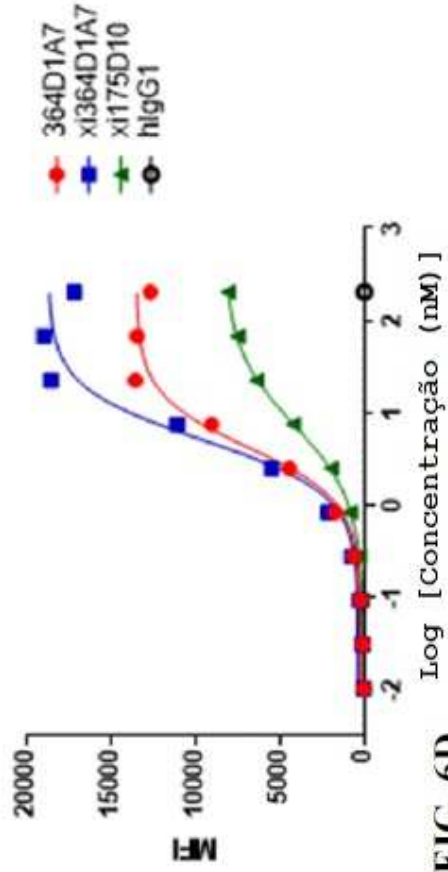


FIG. 6C

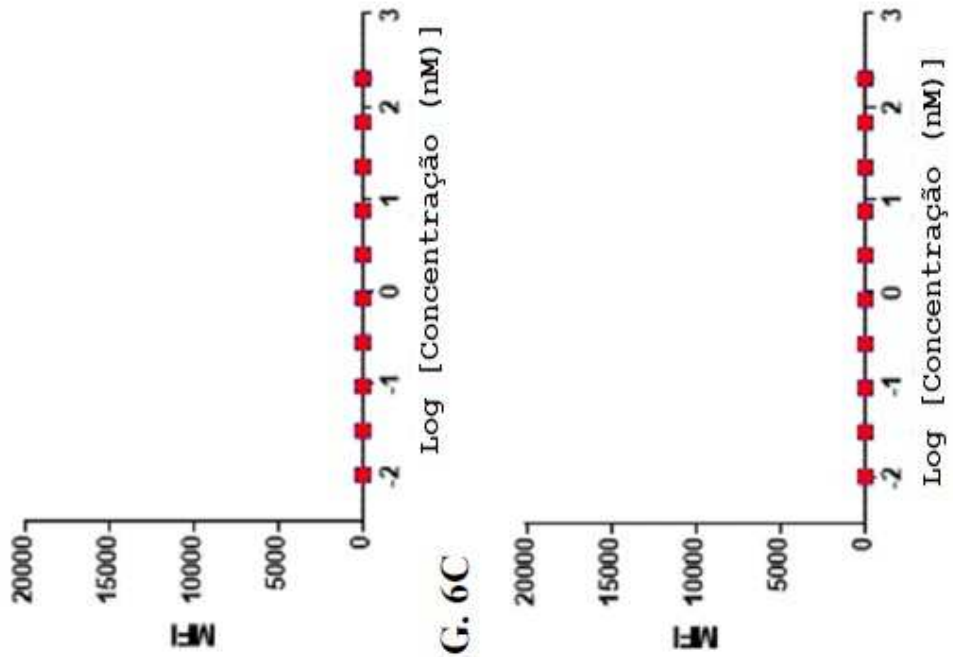
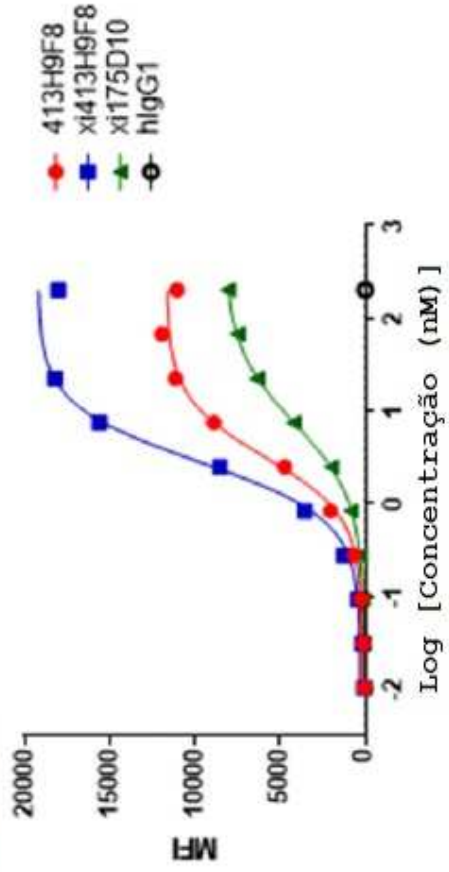
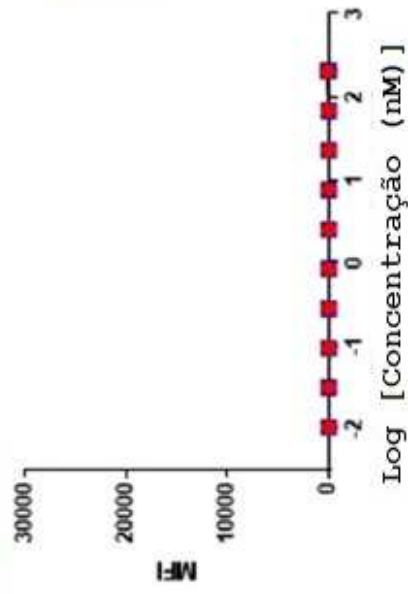


FIG. 6D



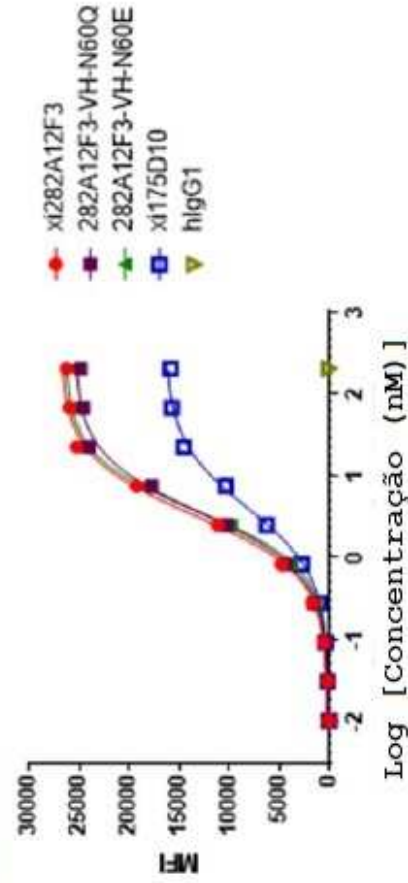
**FIG. 7A**

CHO-CLDN18.1



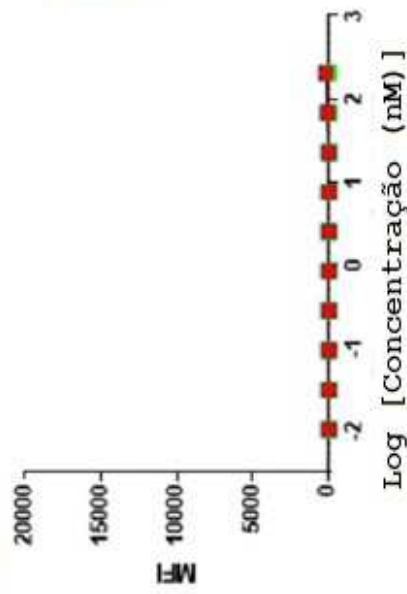
**FIG. 7B**

CHO-CLDN18.2



**FIG. 7C**

CHO-CLDN18.1



**FIG. 7D**

CHO-CLDN18.2

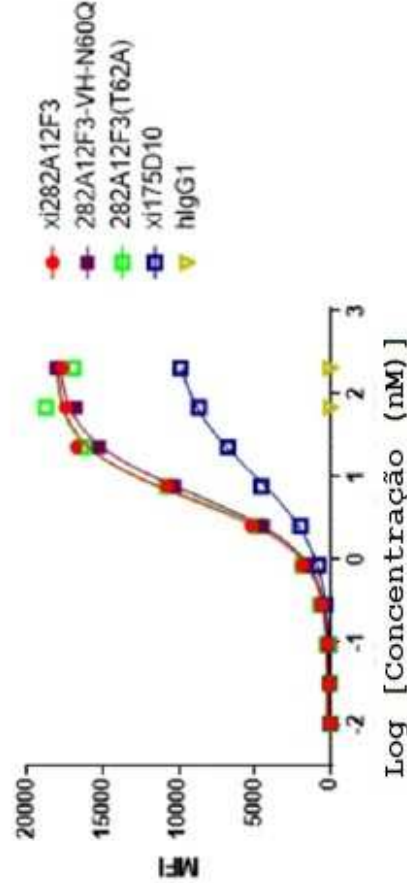


FIG. 8A

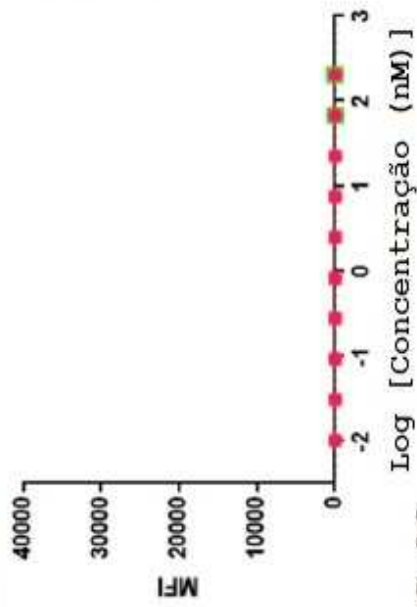


FIG. 8B

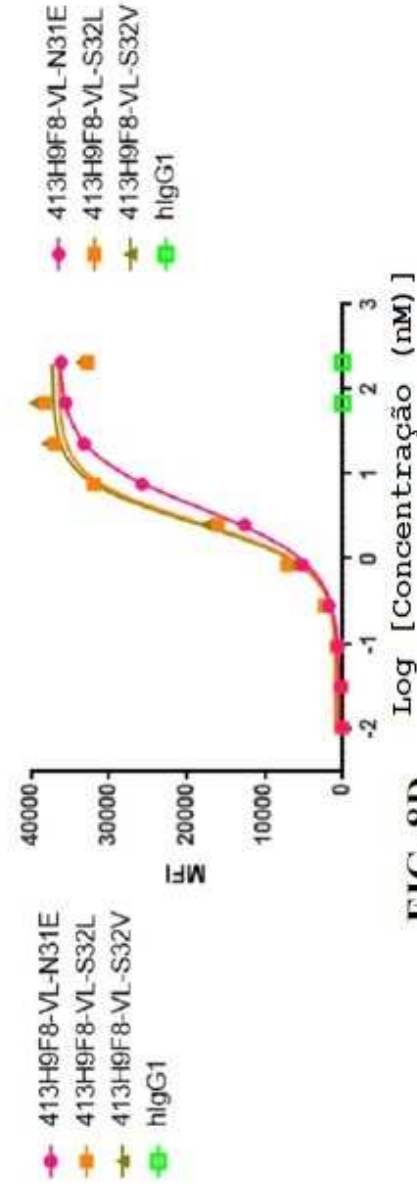


FIG. 8C

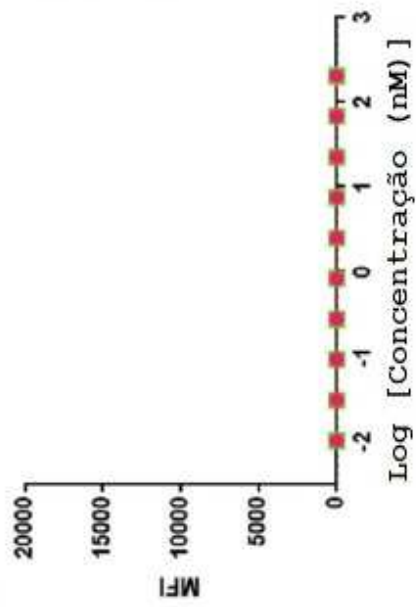
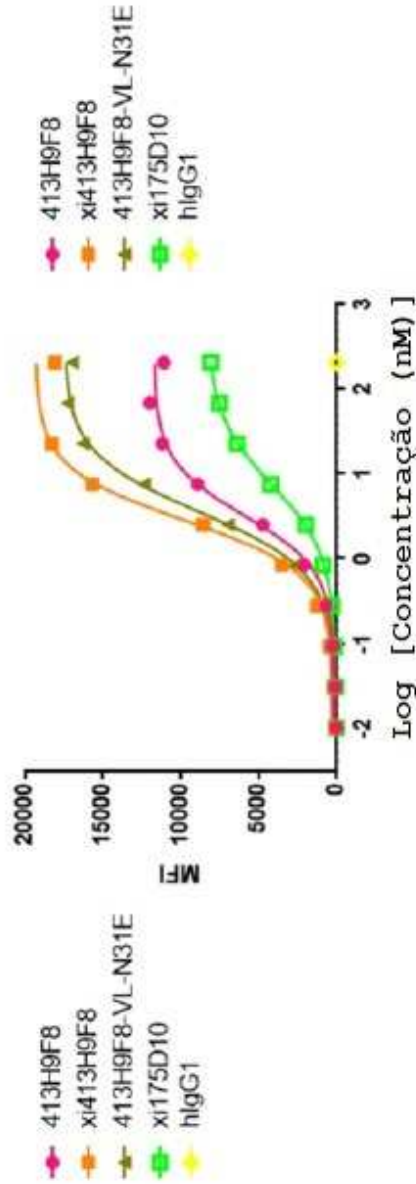
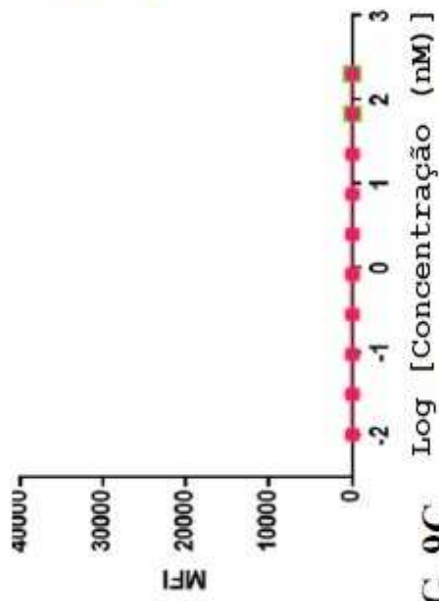


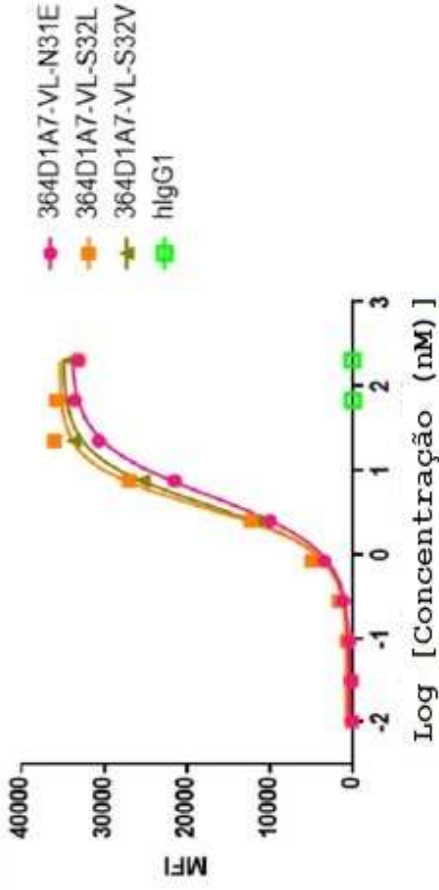
FIG. 8D



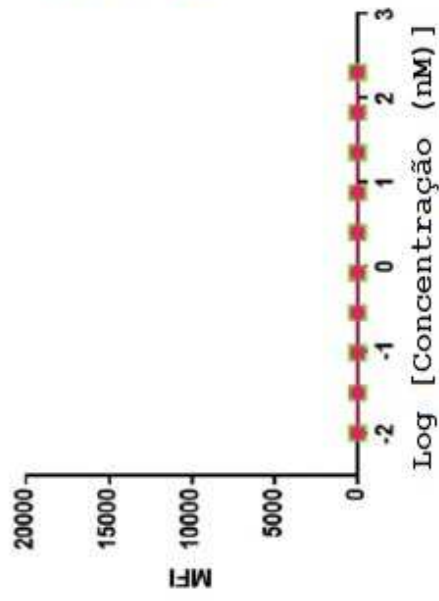
**FIG. 9A**



**FIG. 9B**



**FIG. 9C**



**FIG. 9D**

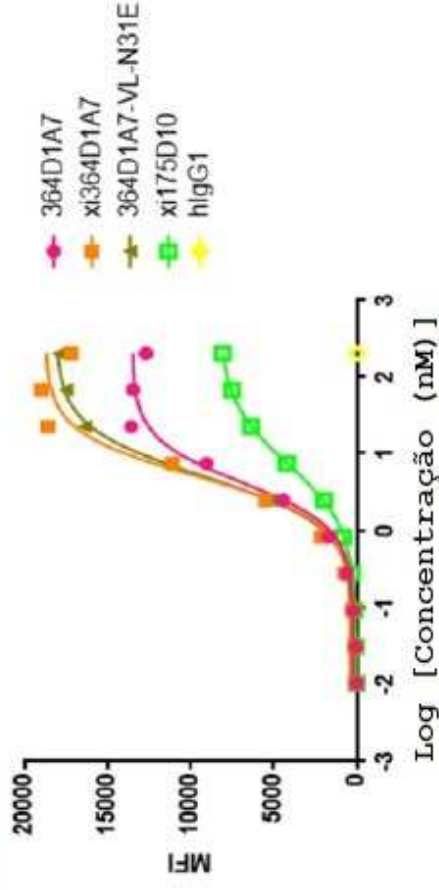


FIG. 10A

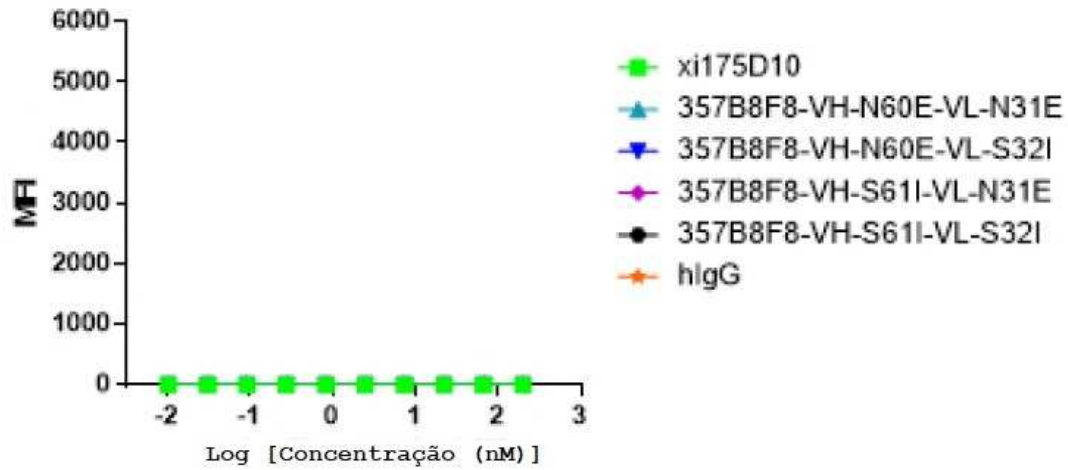


FIG. 10B

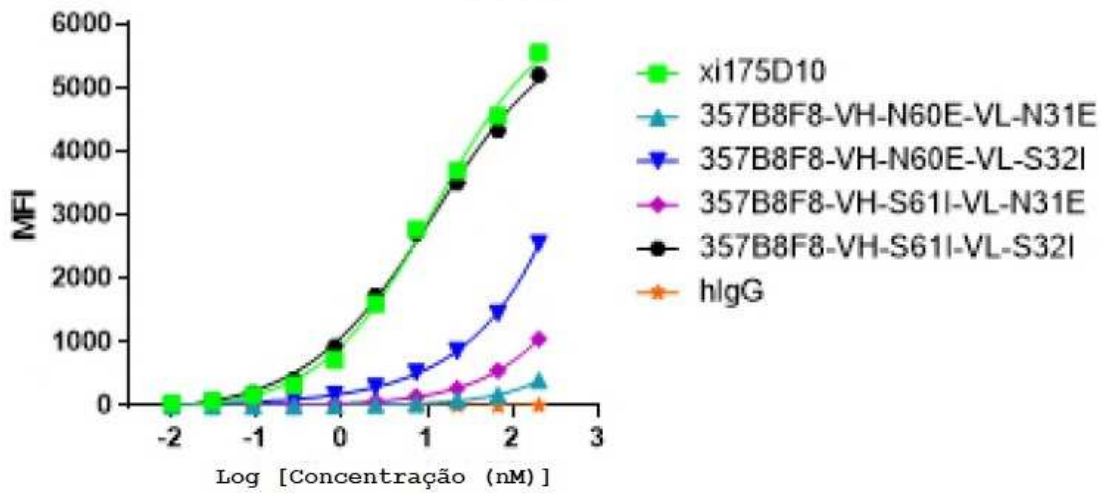


FIG. 11A

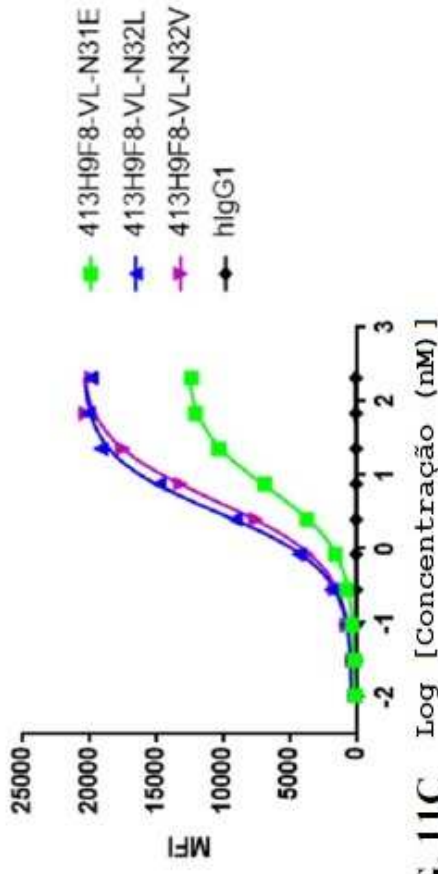


FIG. 11B

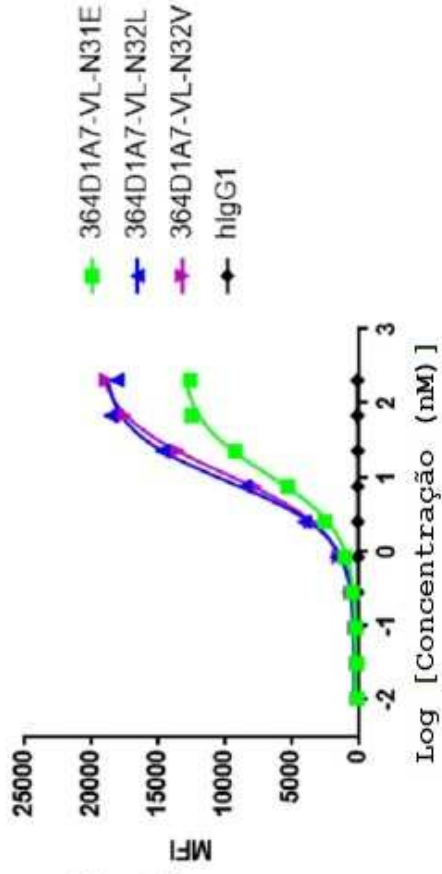


FIG. 11C

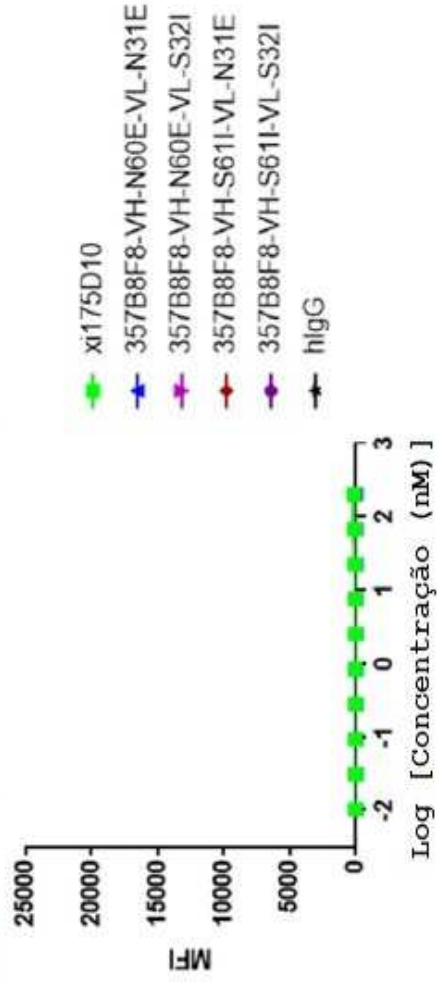


FIG. 12A

xi175D10

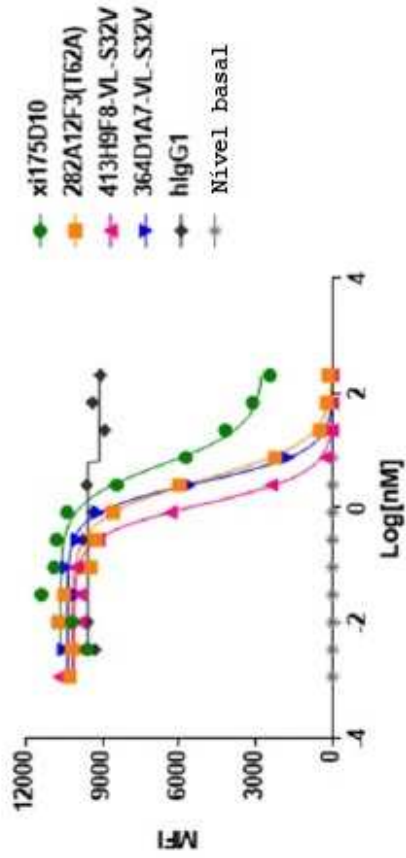


FIG. 12B

282A12F3(T62A)

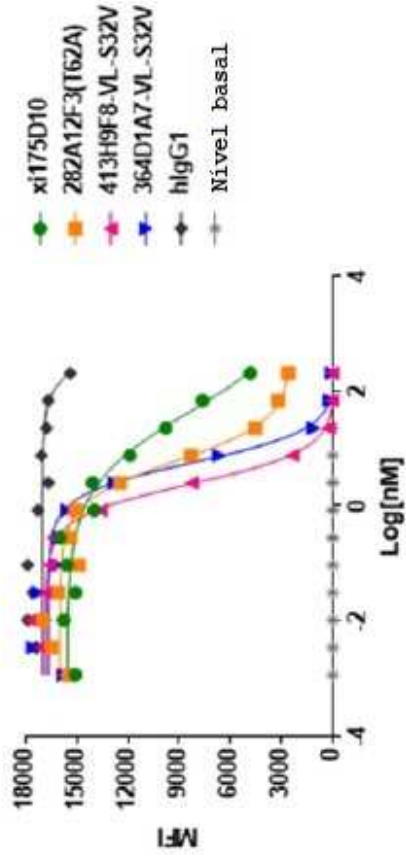


FIG. 12C

413H9F8-VL-S32V

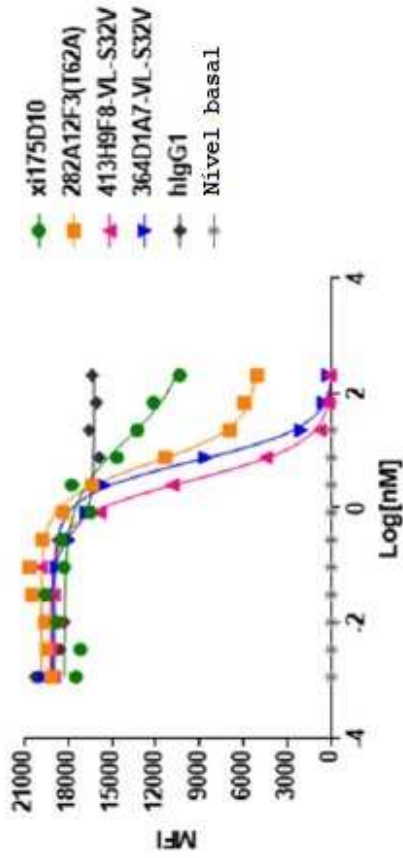


FIG. 12D

364D1A7-VL-S32V

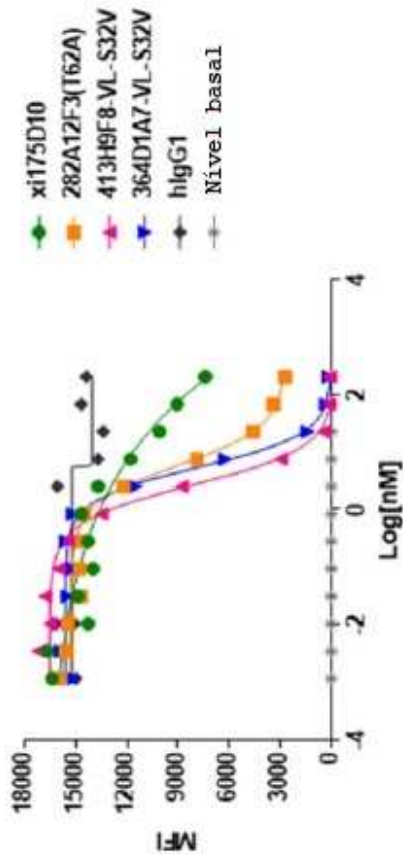


FIG. 13A

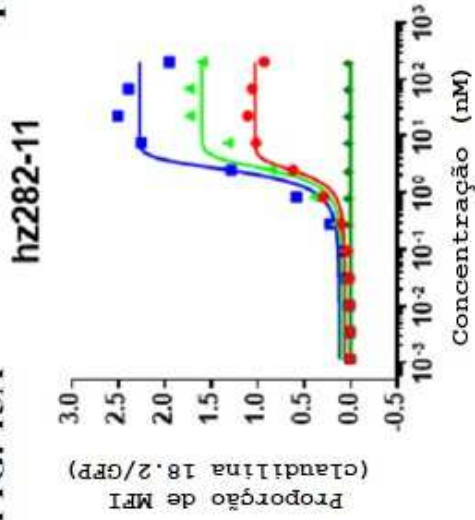
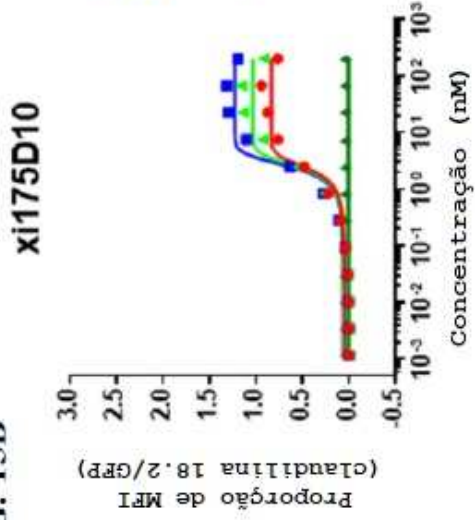


FIG. 13B



Camundongo  
Humano  
Cynomolgus  
hlgG1

FIG. 13C

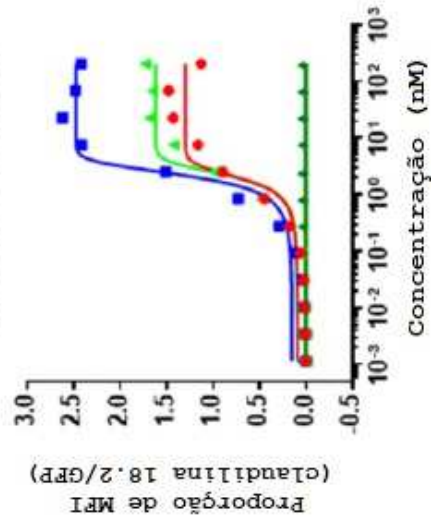


FIG. 13D

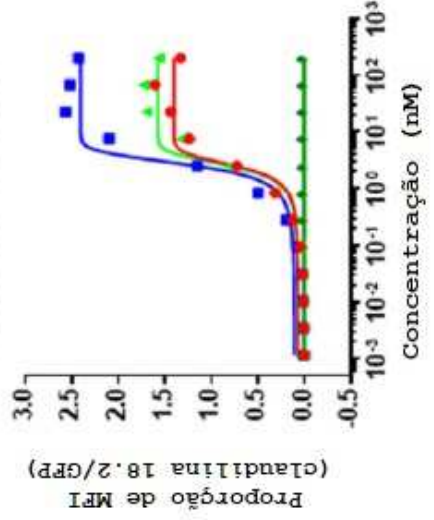
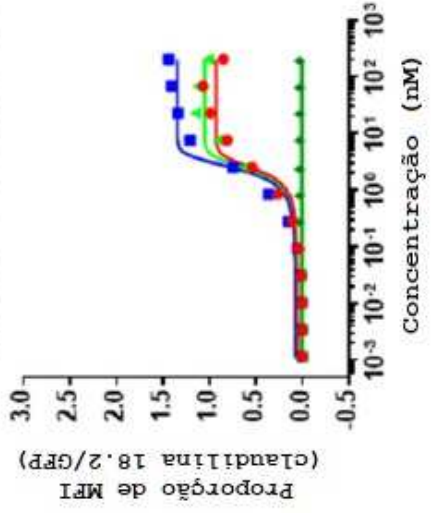


FIG. 13E



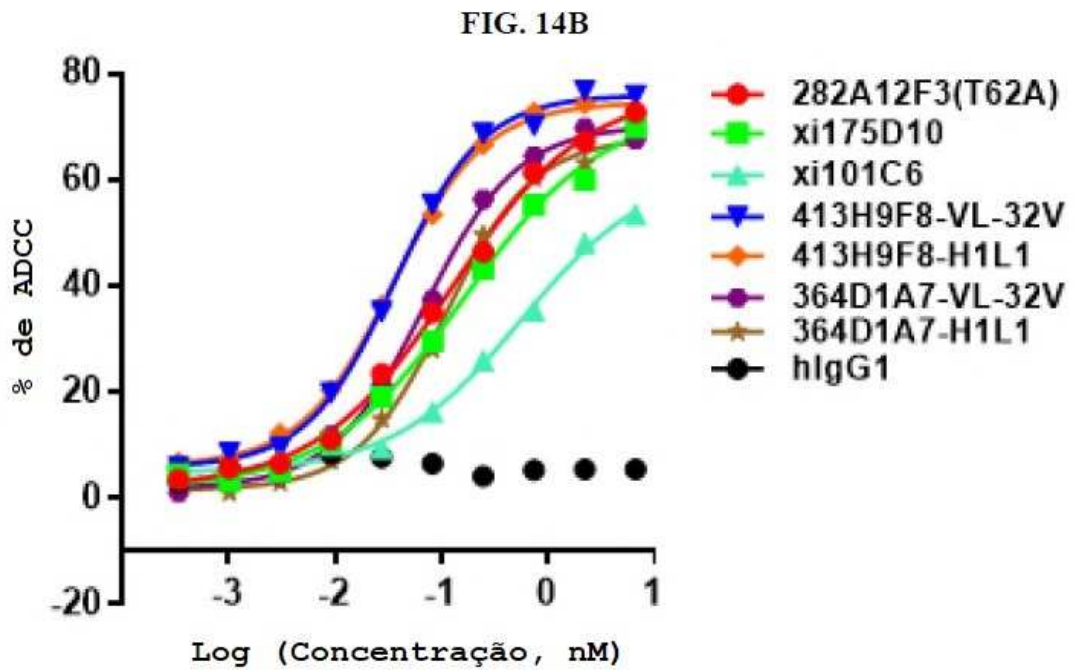
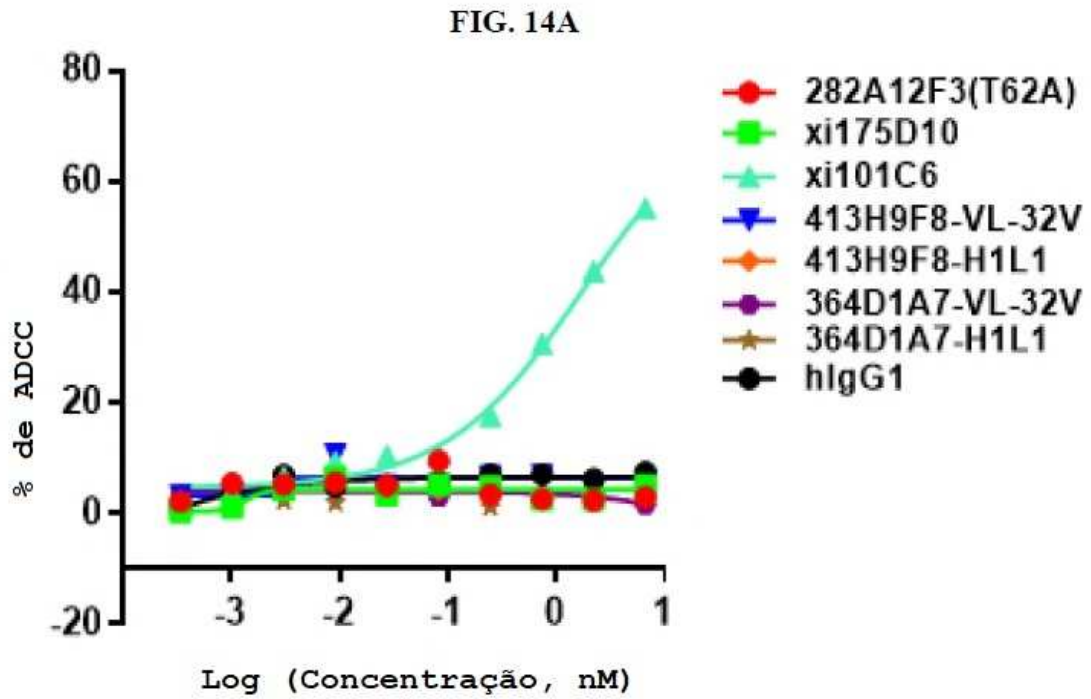


FIG. 15

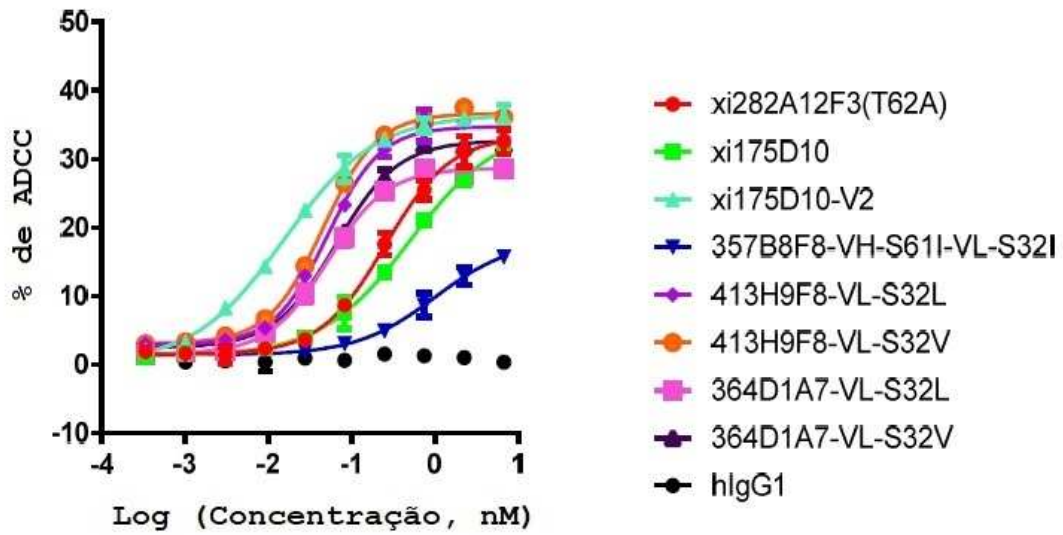


FIG. 16

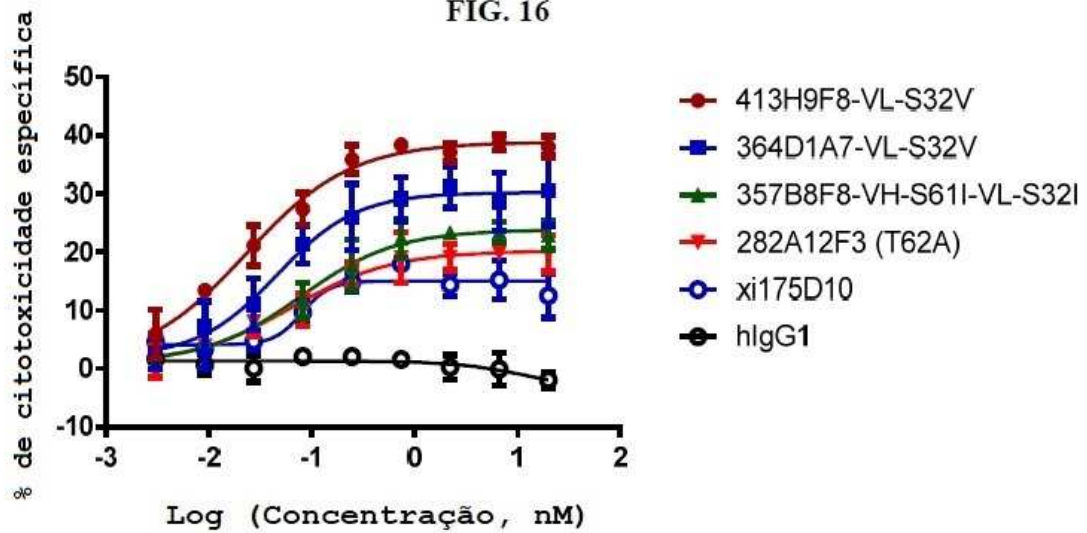


FIG. 17

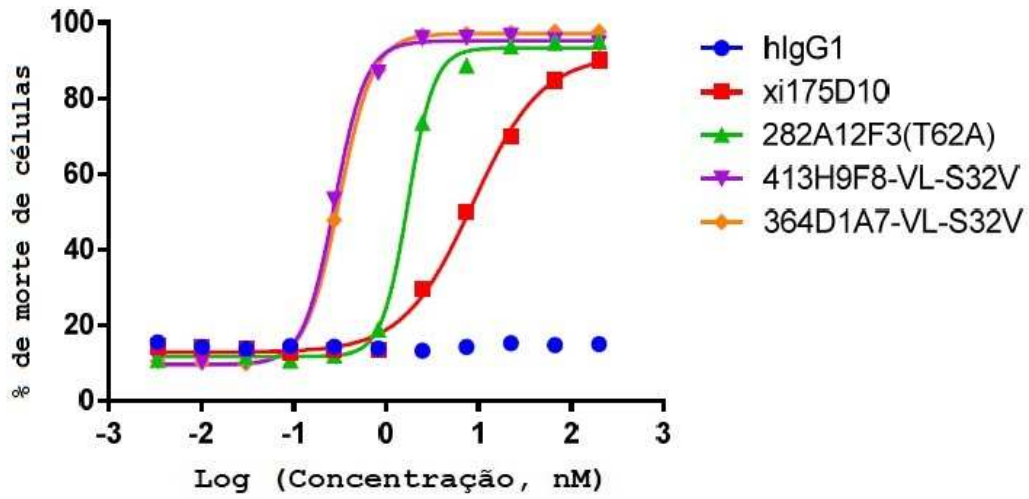


FIG. 18A

Ligação do anticorpo à CHO-CLDN18.2

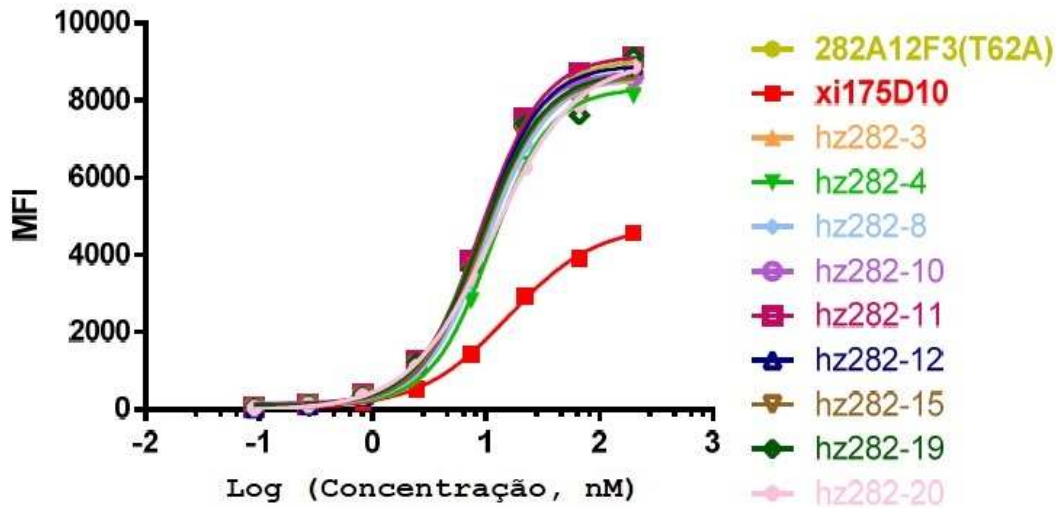


FIG. 18B

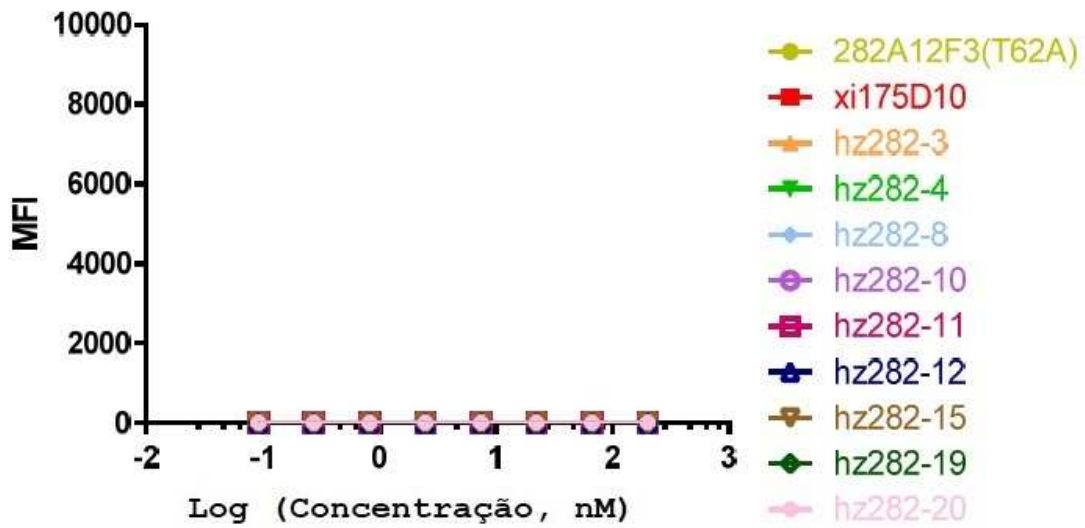


FIG. 19A

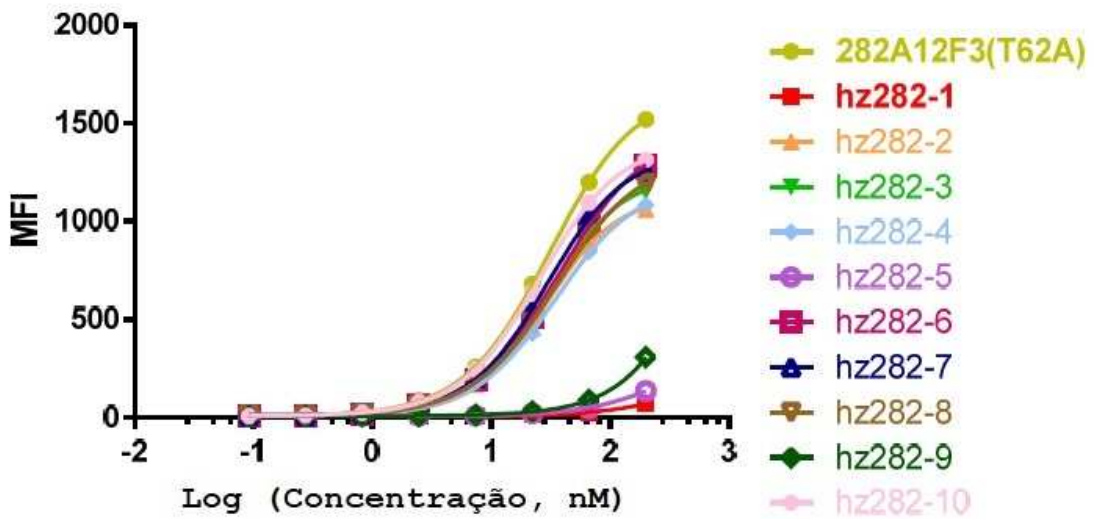


FIG. 19B

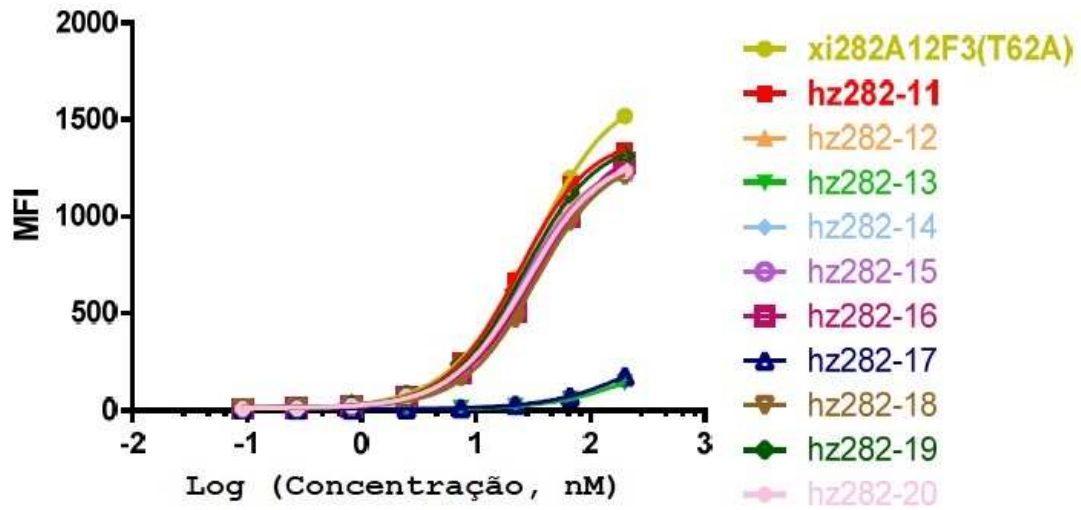


FIG. 20A

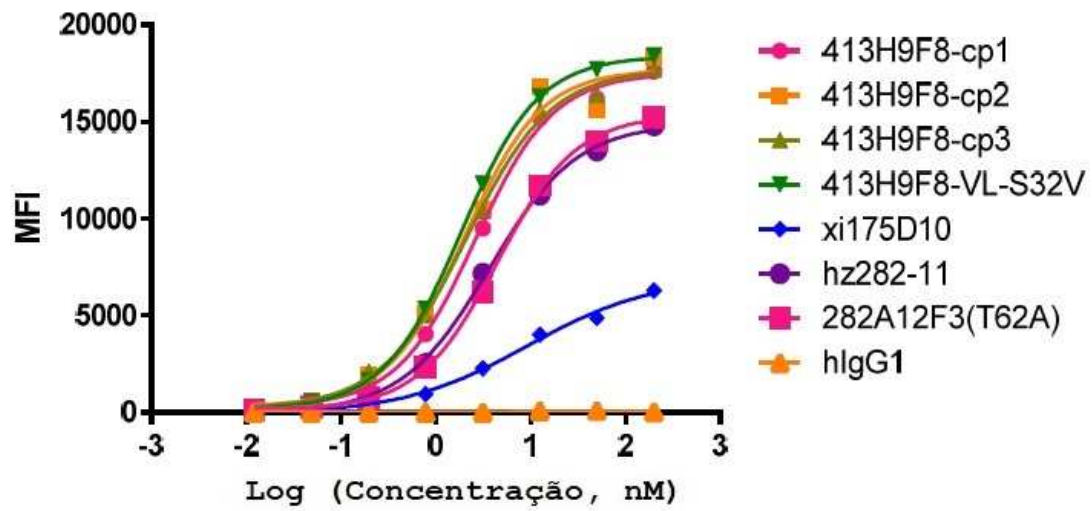


FIG. 20B

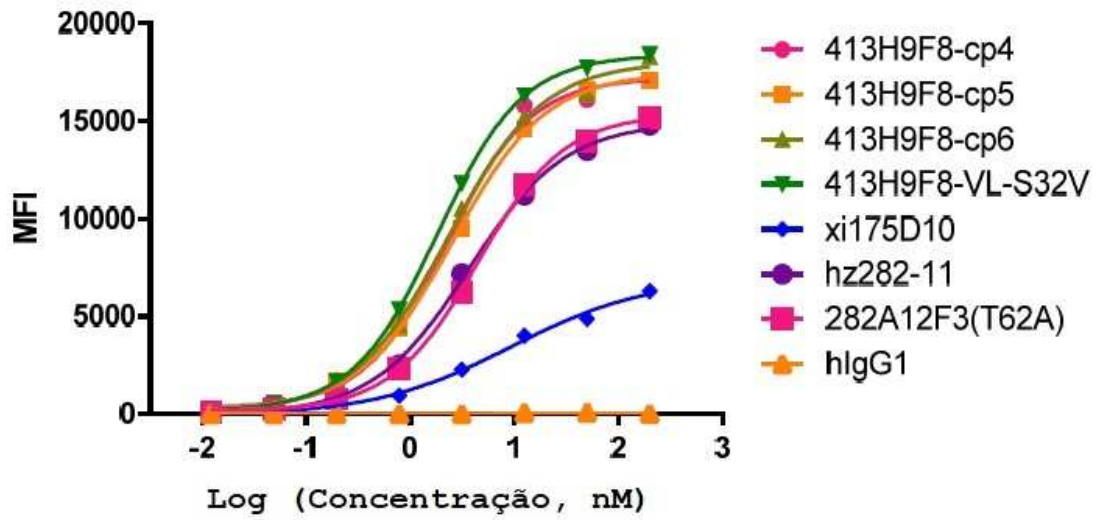


FIG. 20C

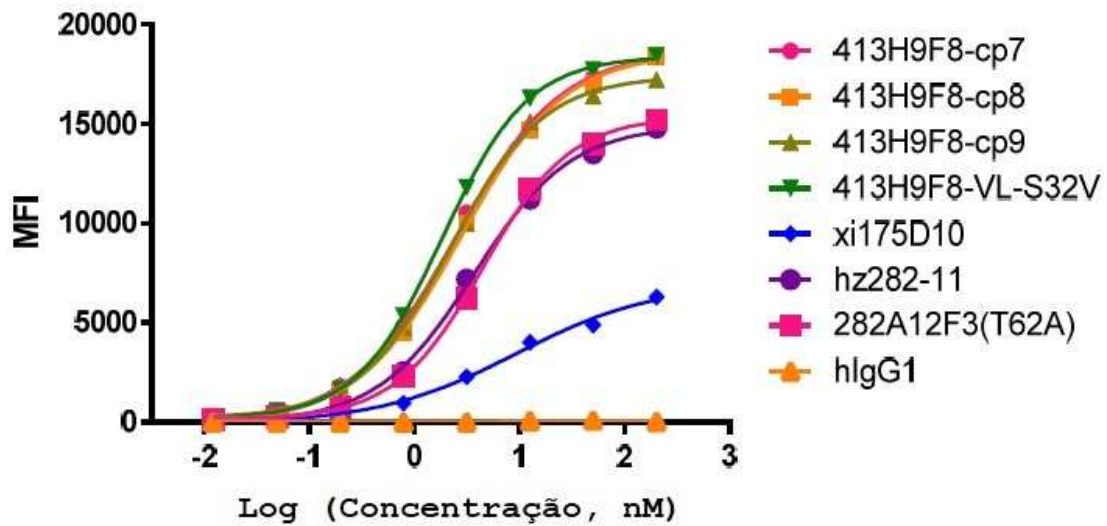


FIG. 20D

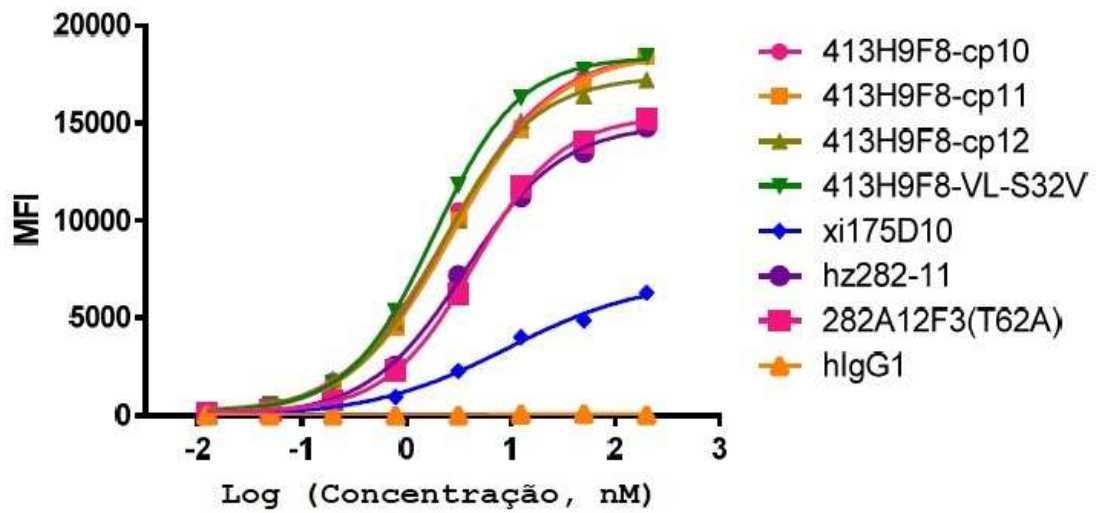


FIG. 21A

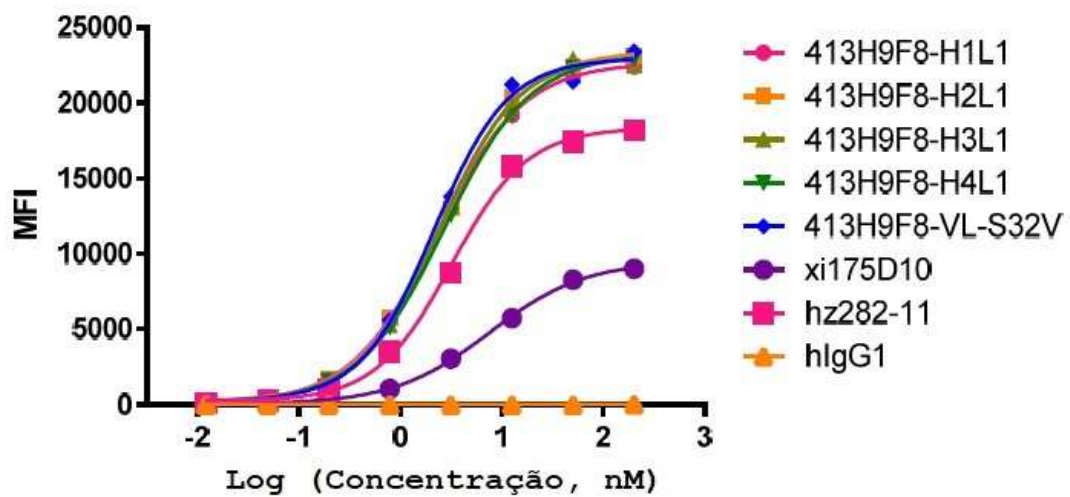


FIG. 21B

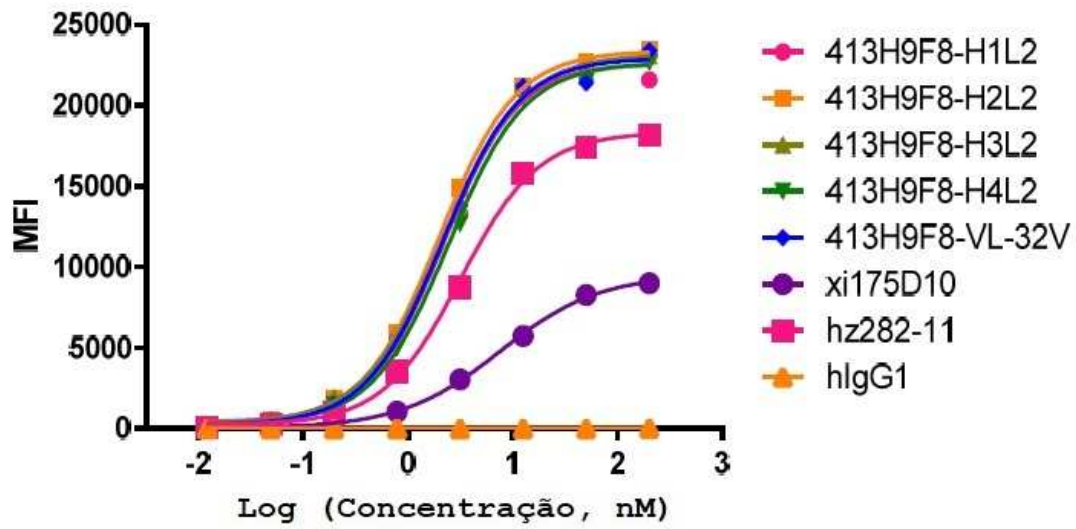


FIG. 21C

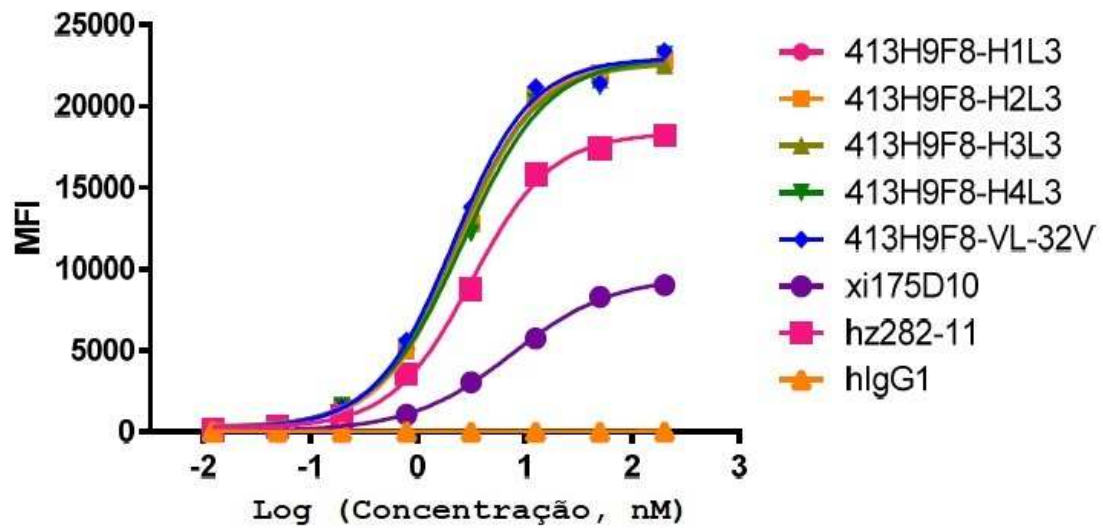


FIG. 21D

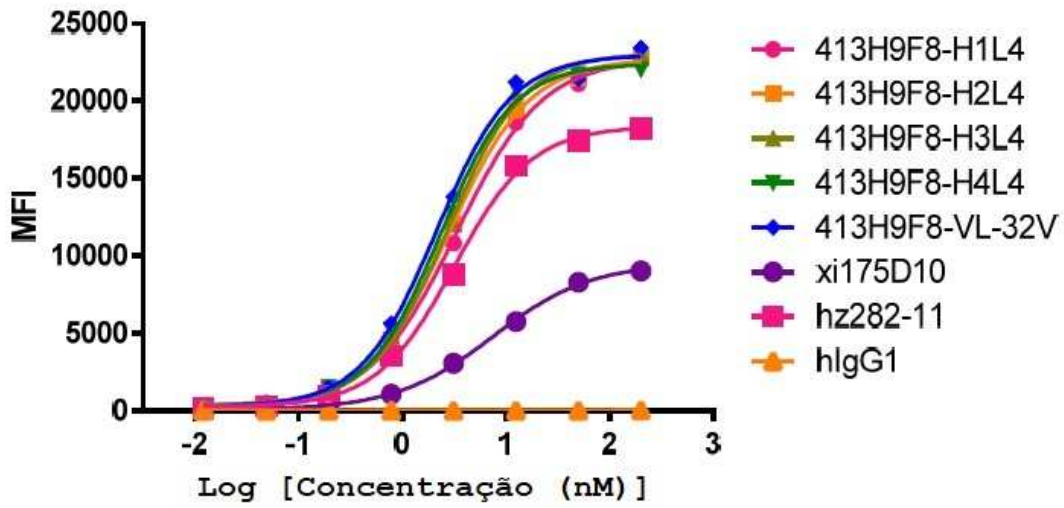


FIG. 22A

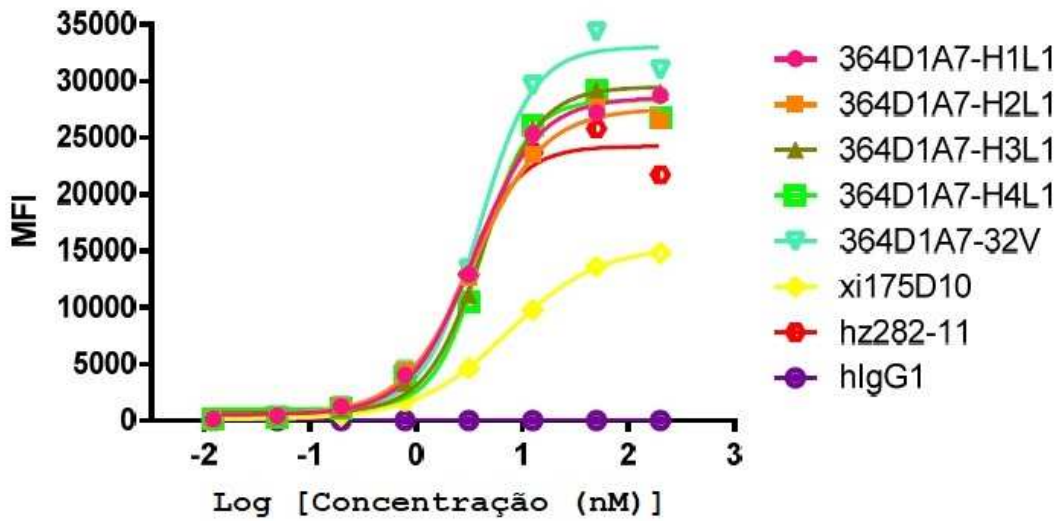


FIG. 22B

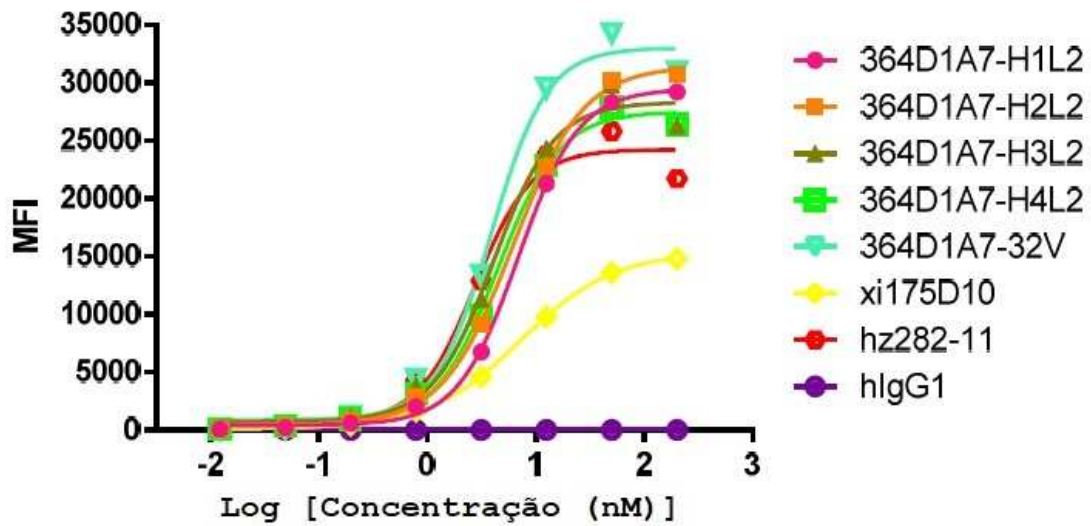


FIG. 22C

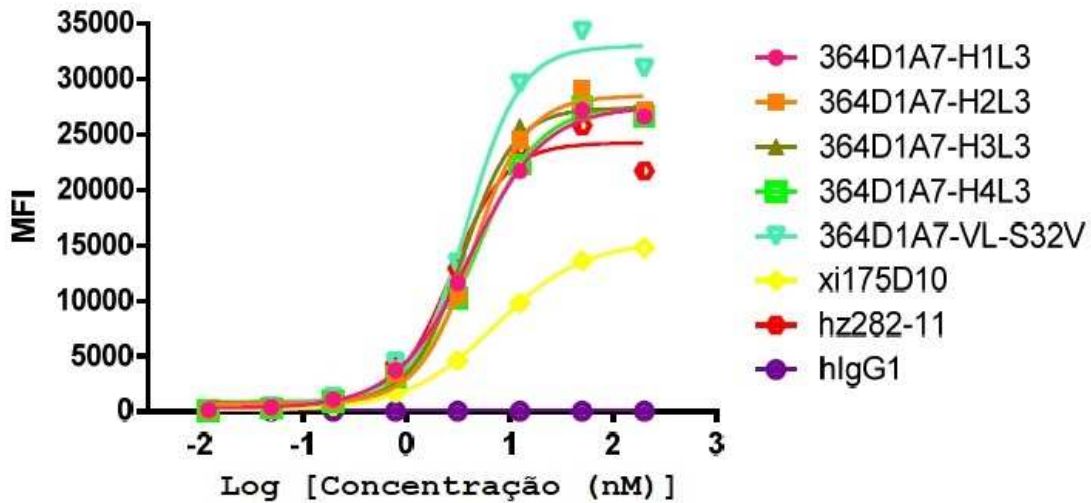


FIG. 22D

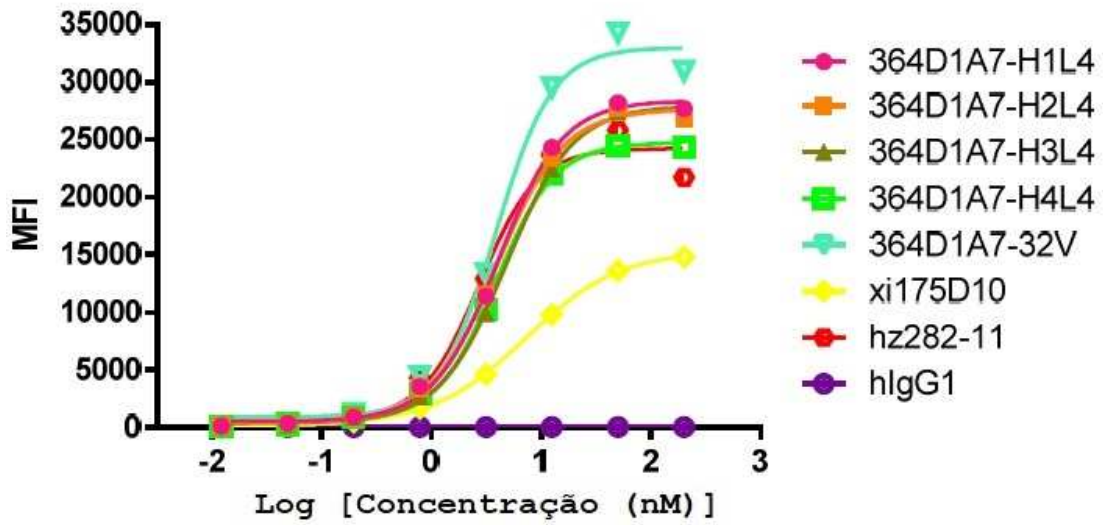


FIG. 22E

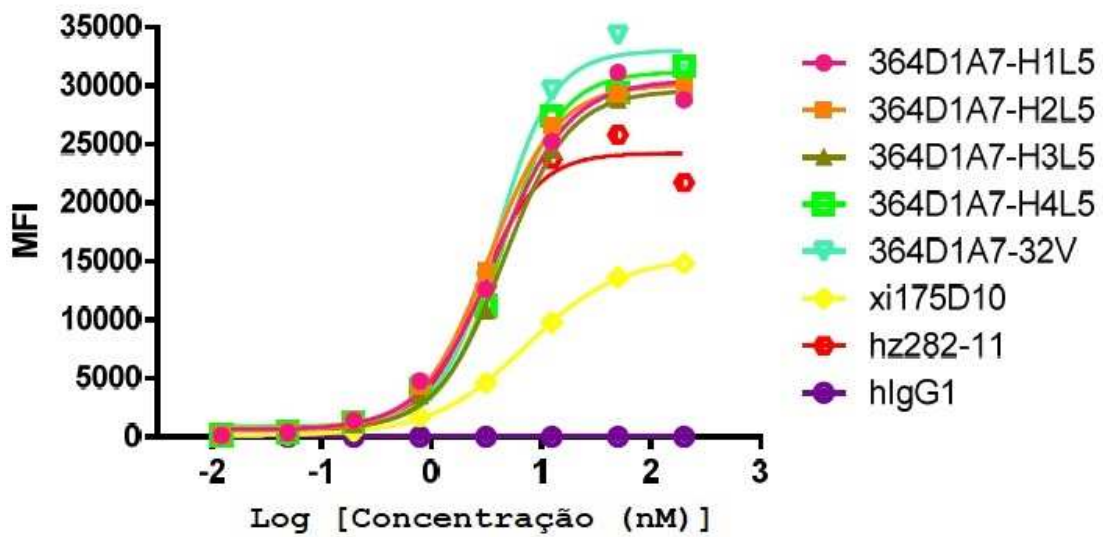


FIG. 23A

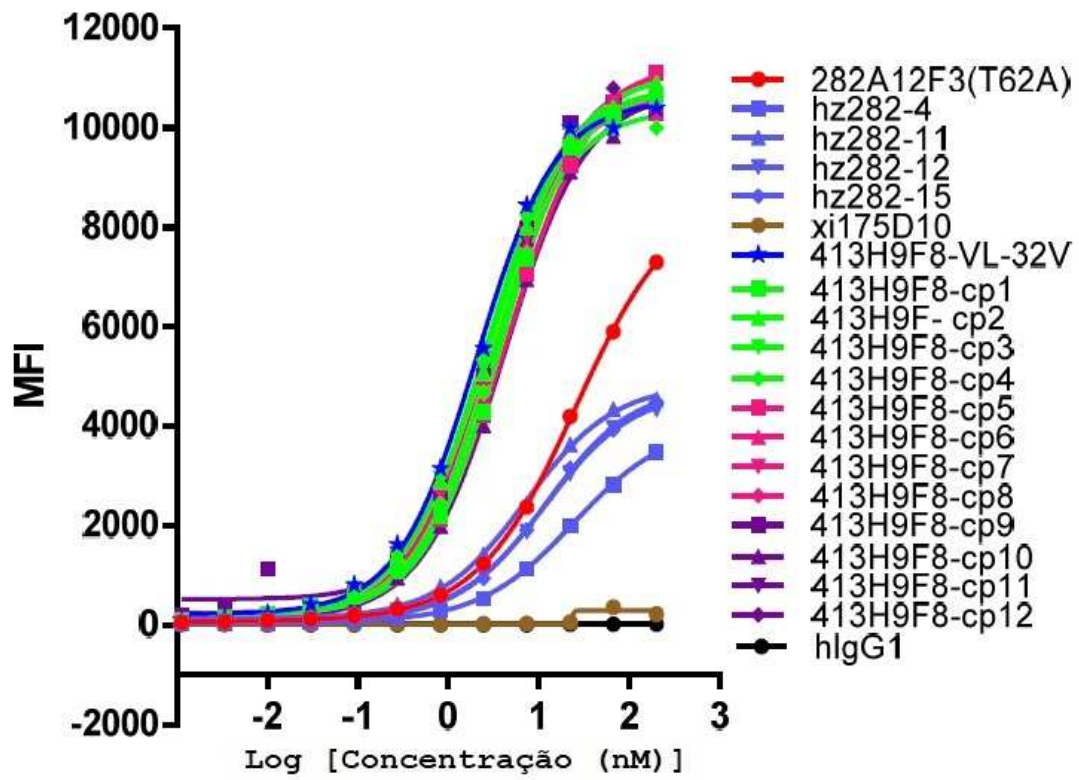


FIG. 23B

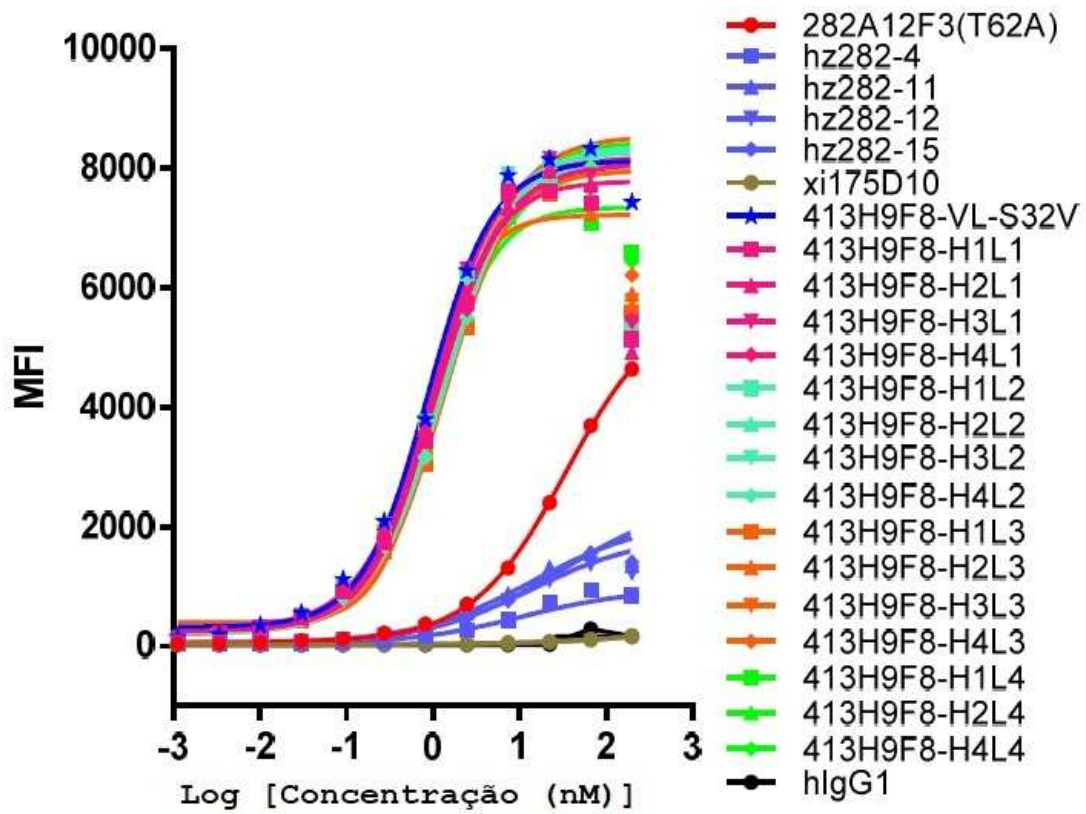


FIG. 23C

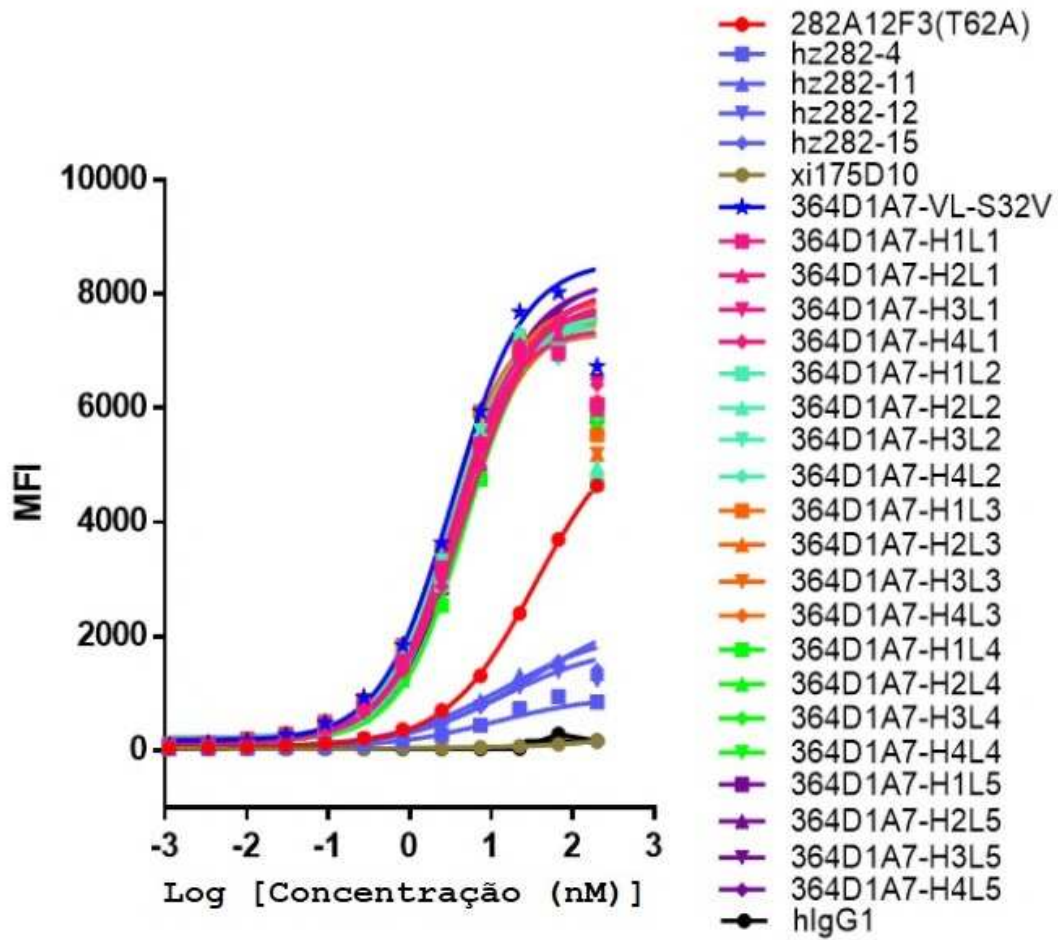


FIG. 24A

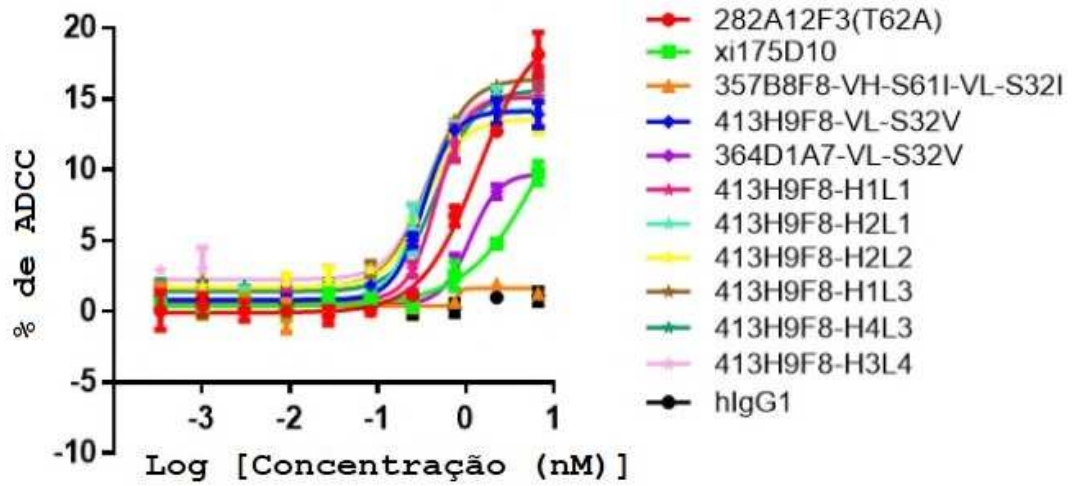


FIG. 24B

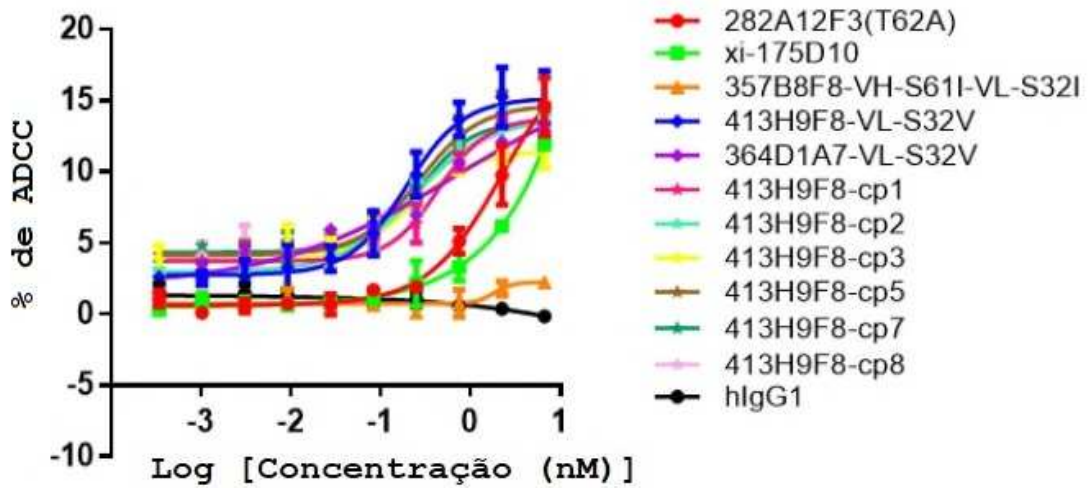


FIG. 24C

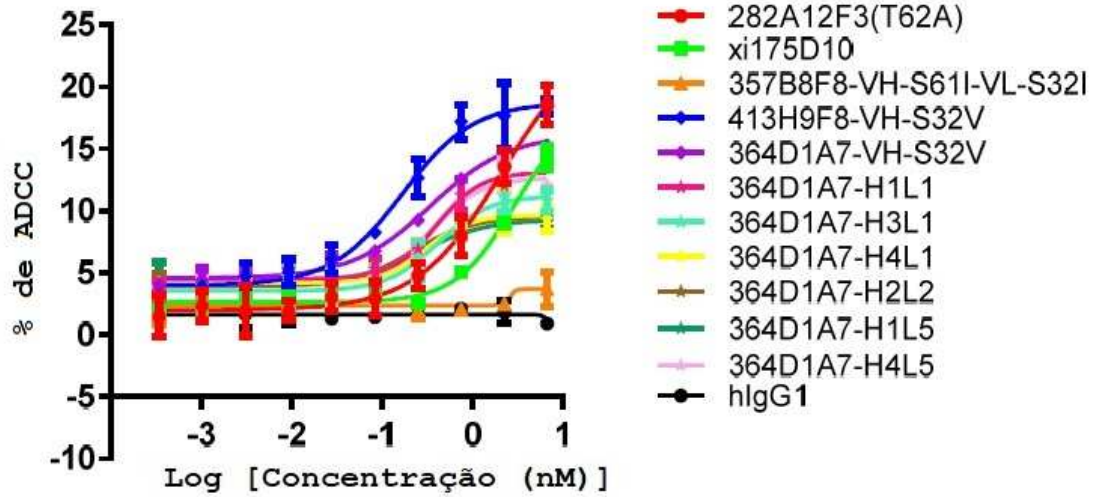


FIG. 25A

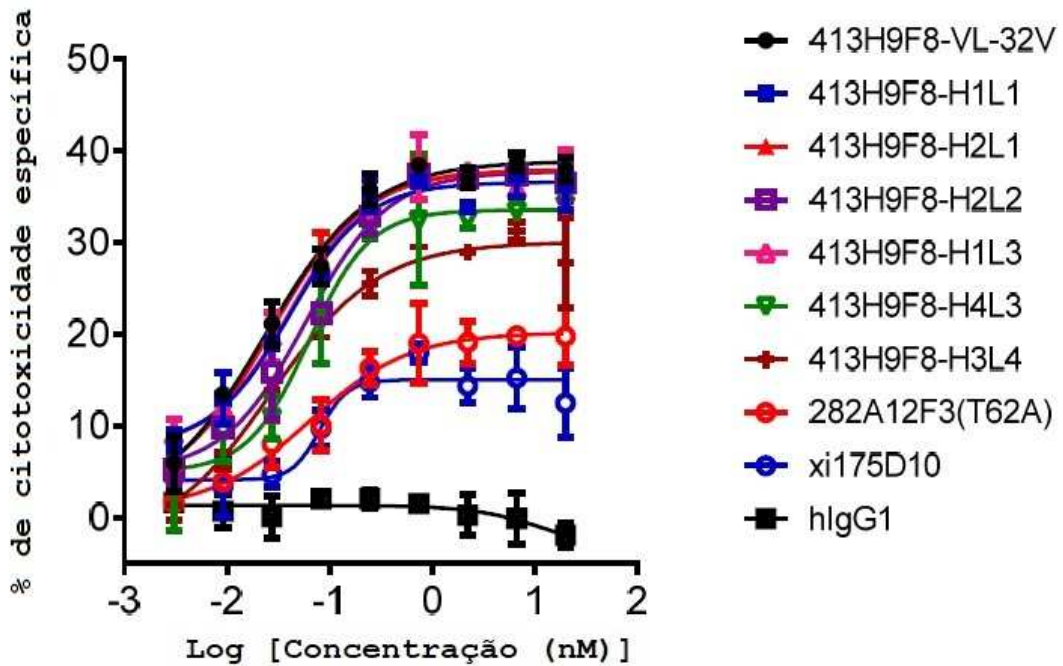


FIG. 25B

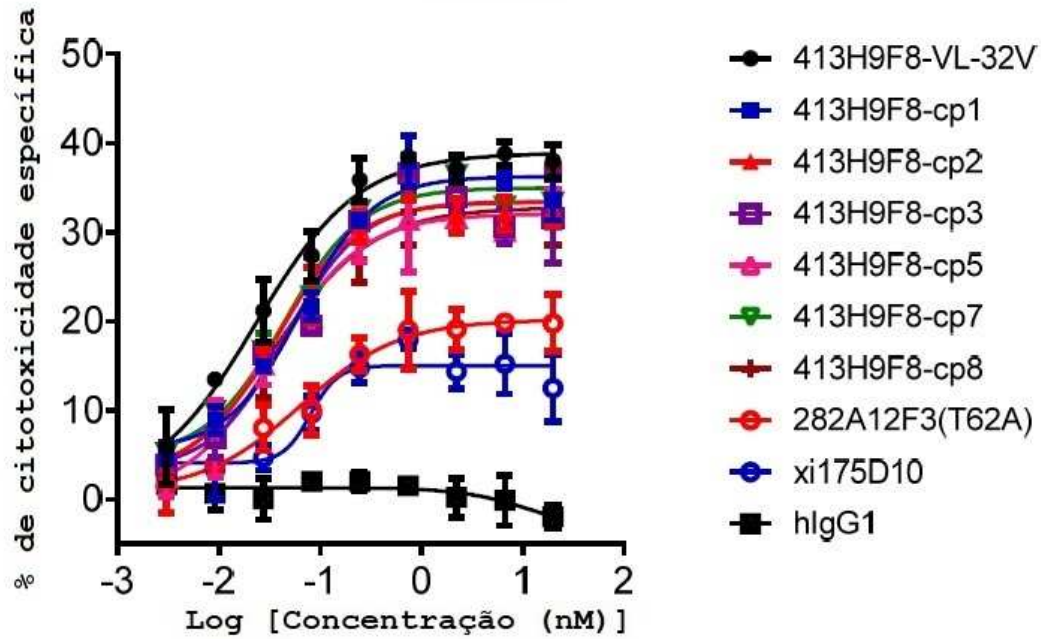


FIG. 25C

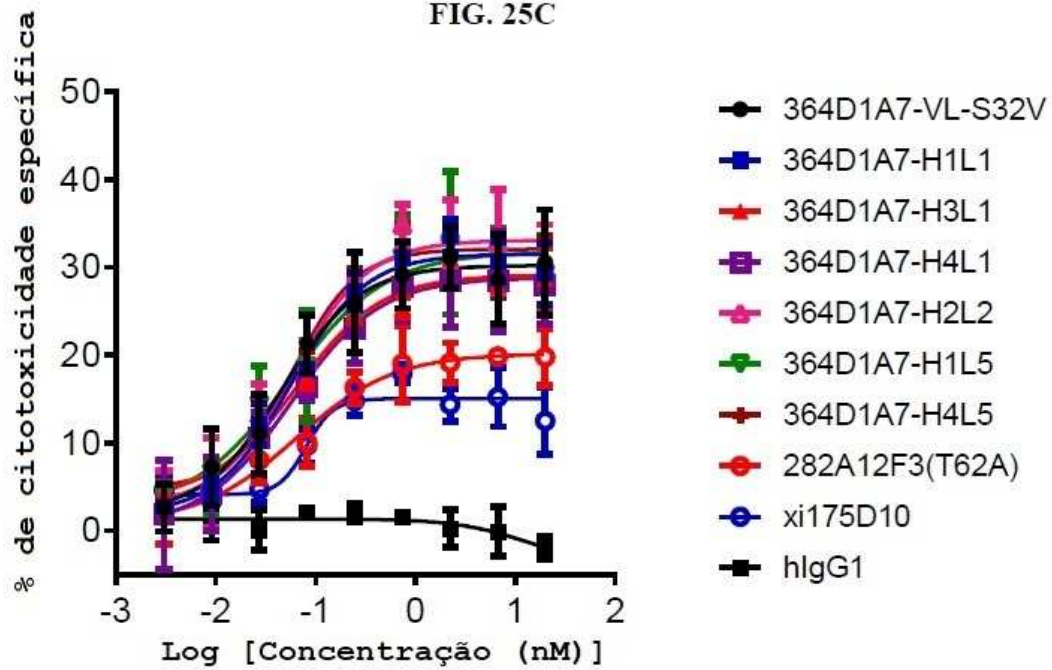


FIG. 26A

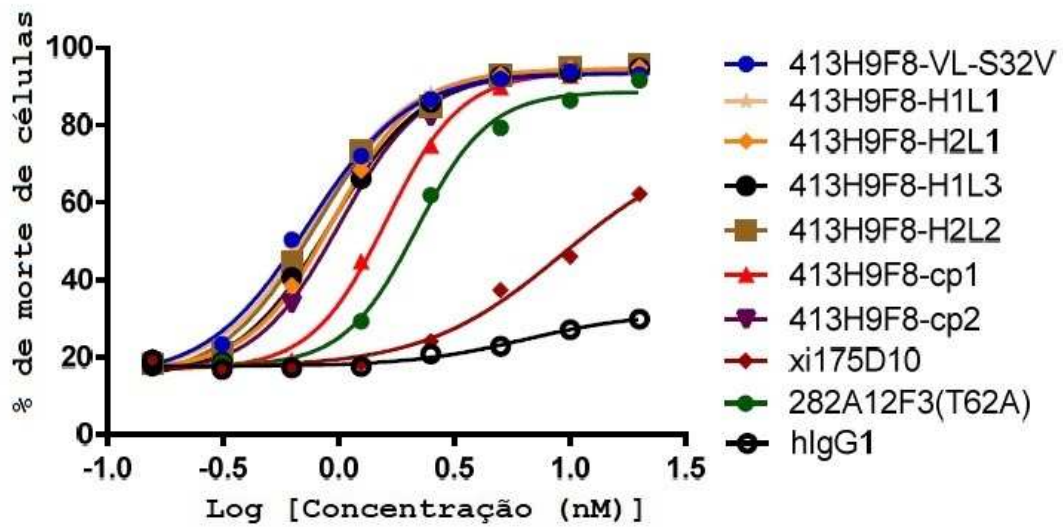


FIG. 26B

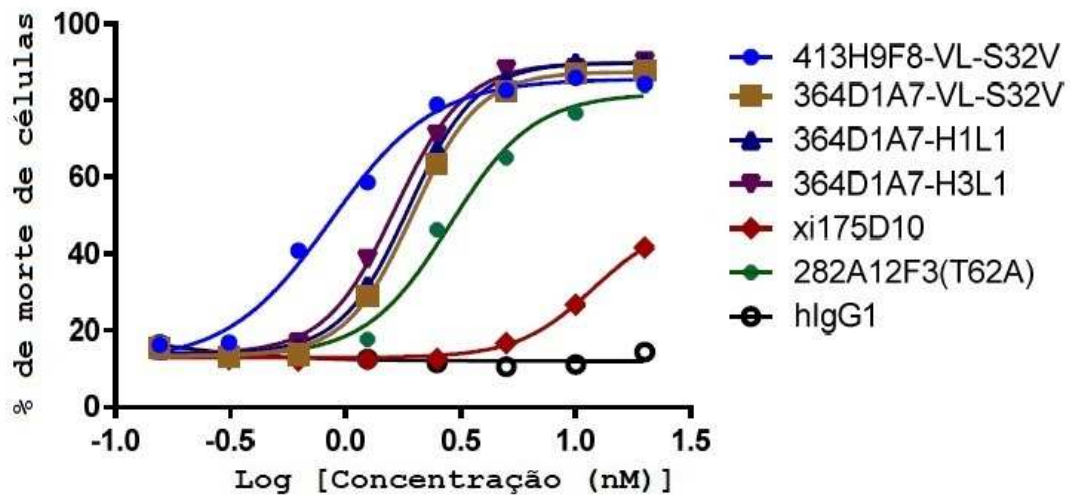


FIG. 27

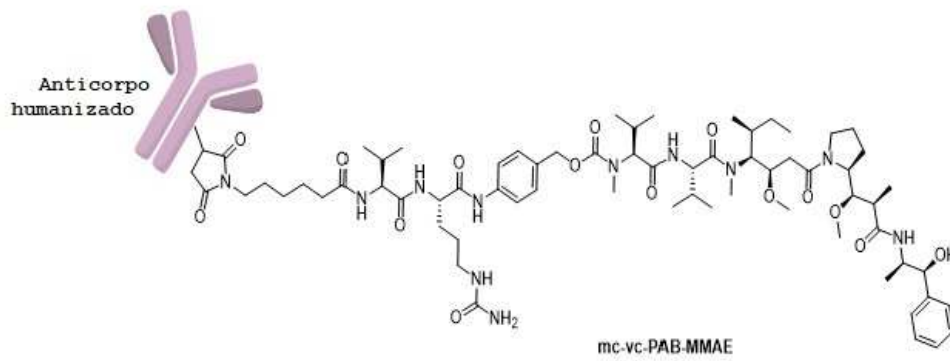


FIG. 28A

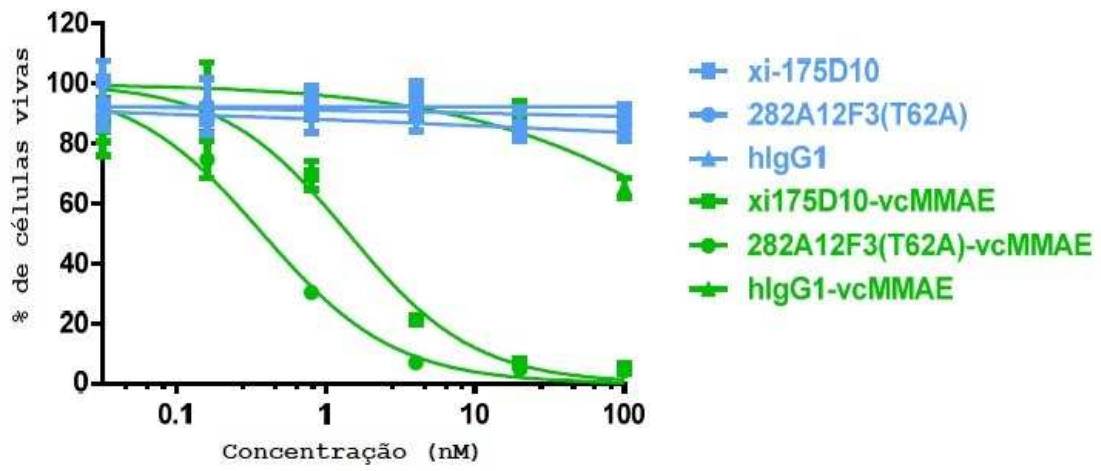


FIG. 28B

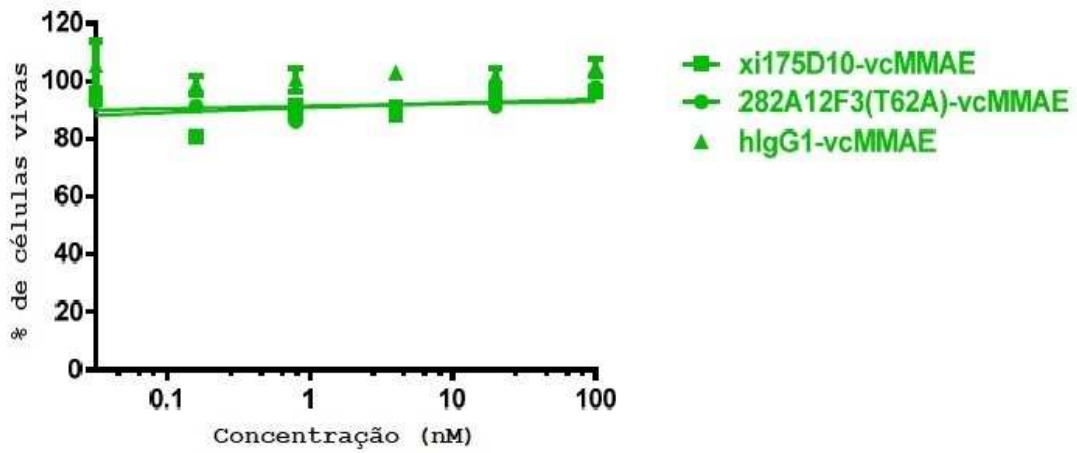


FIG. 29A

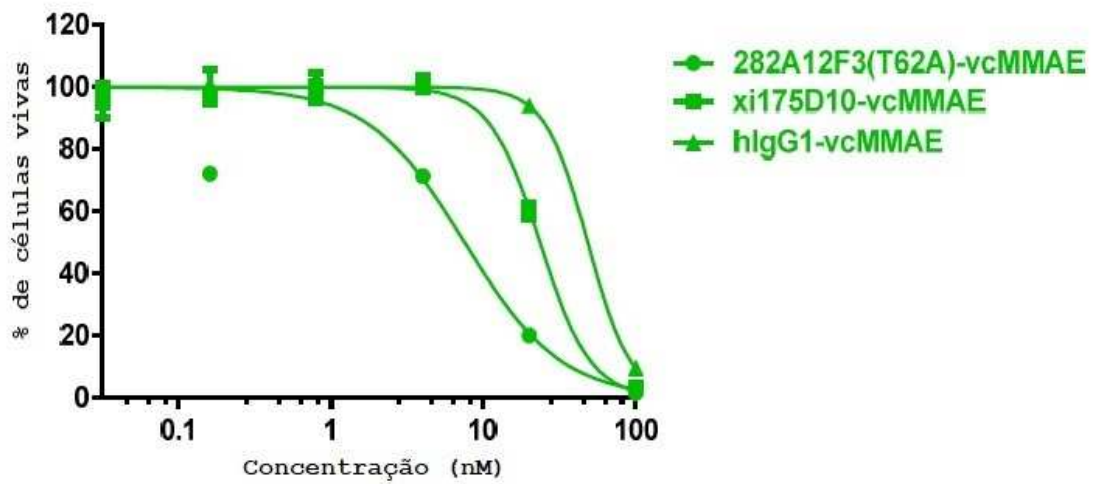


FIG. 29B

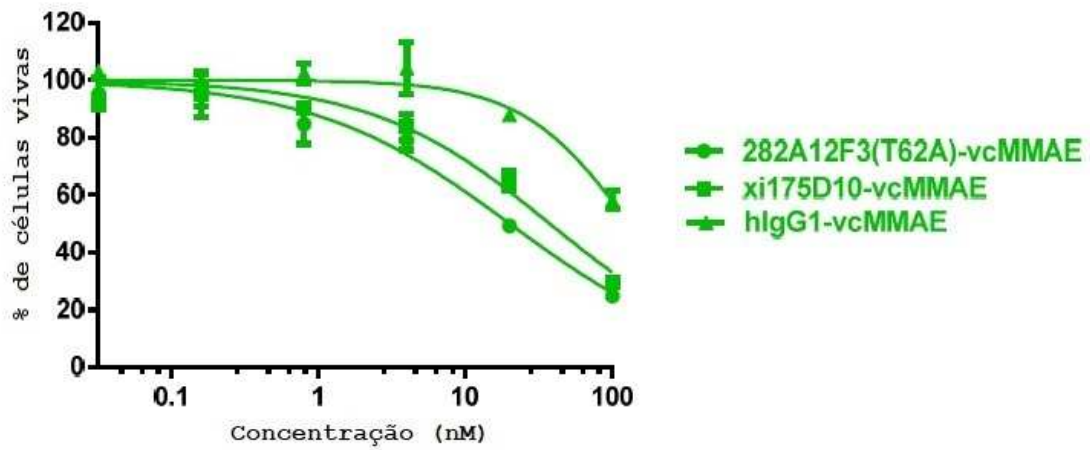


FIG. 30A

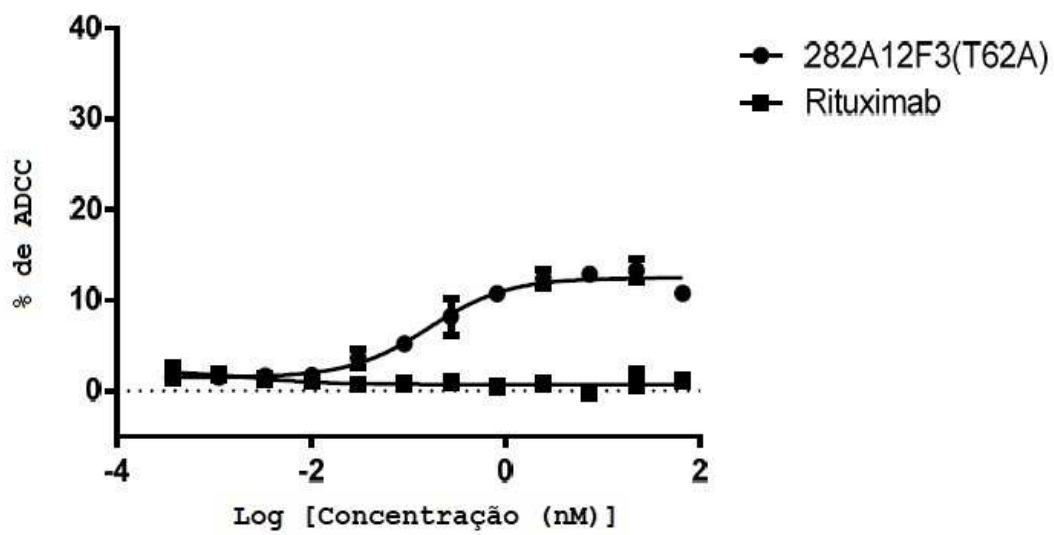
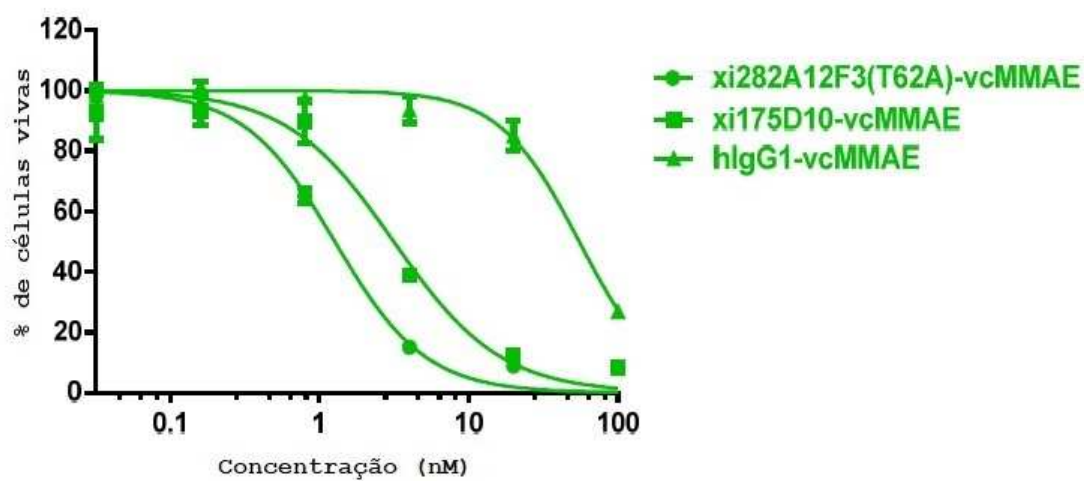


FIG. 30B



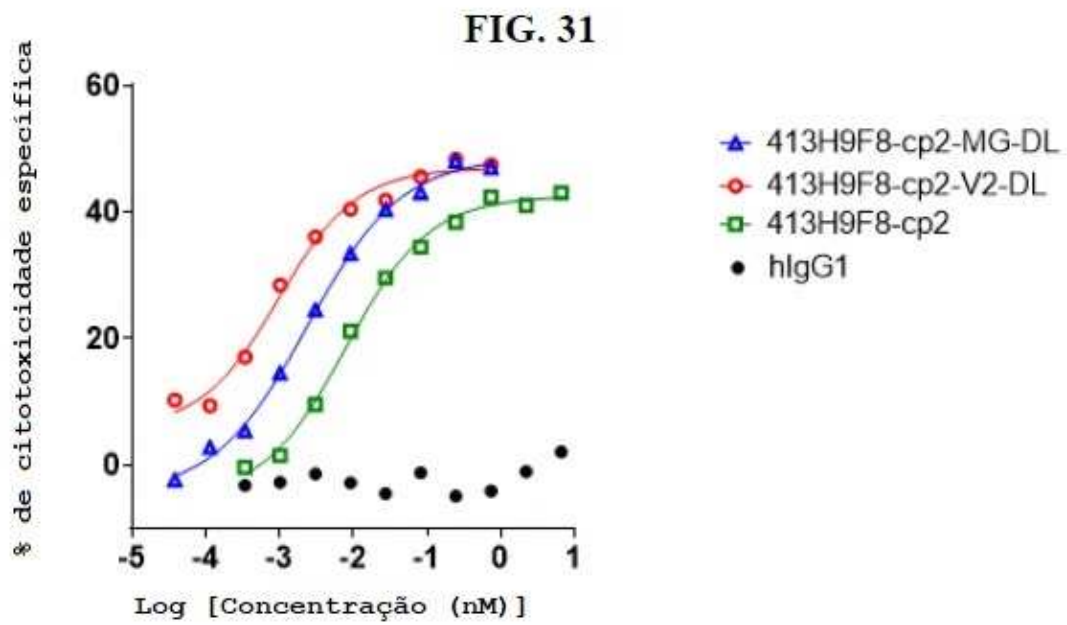


FIG. 32

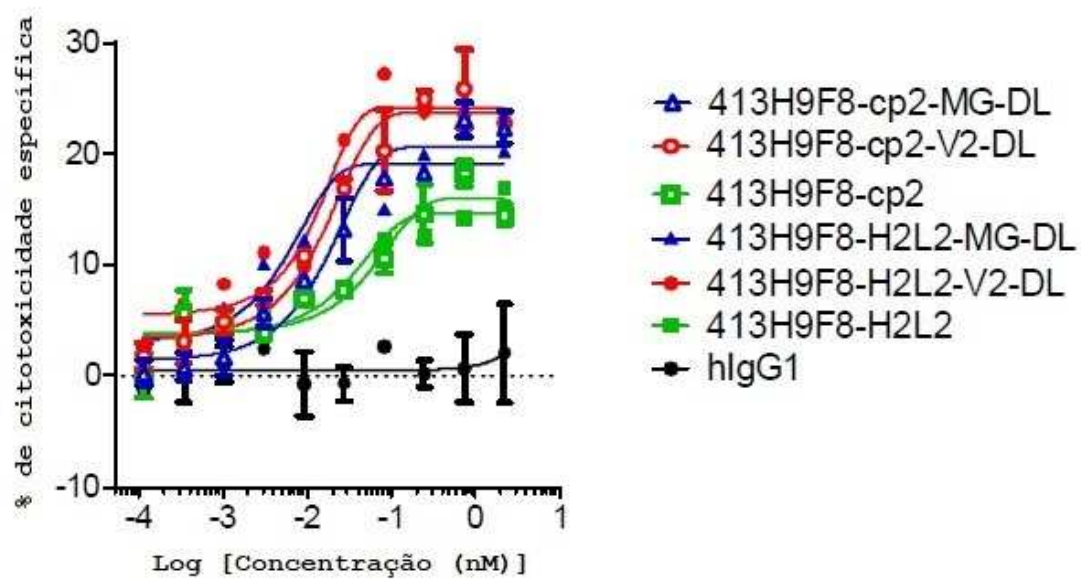


FIG. 33A

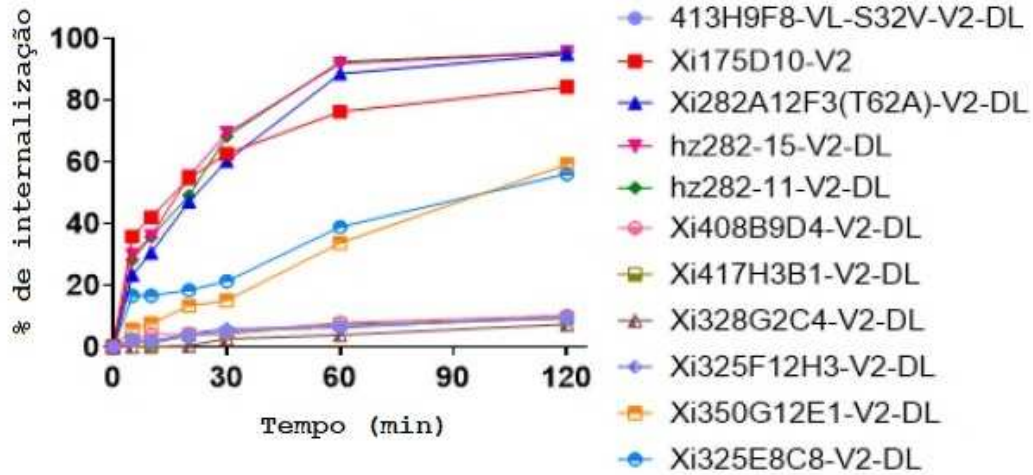


FIG. 33B

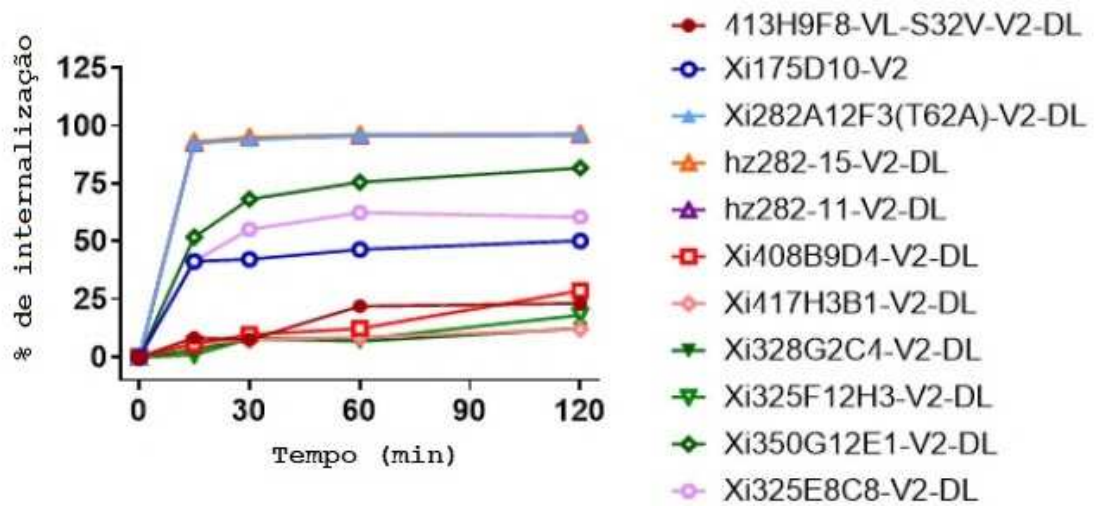


FIG. 34

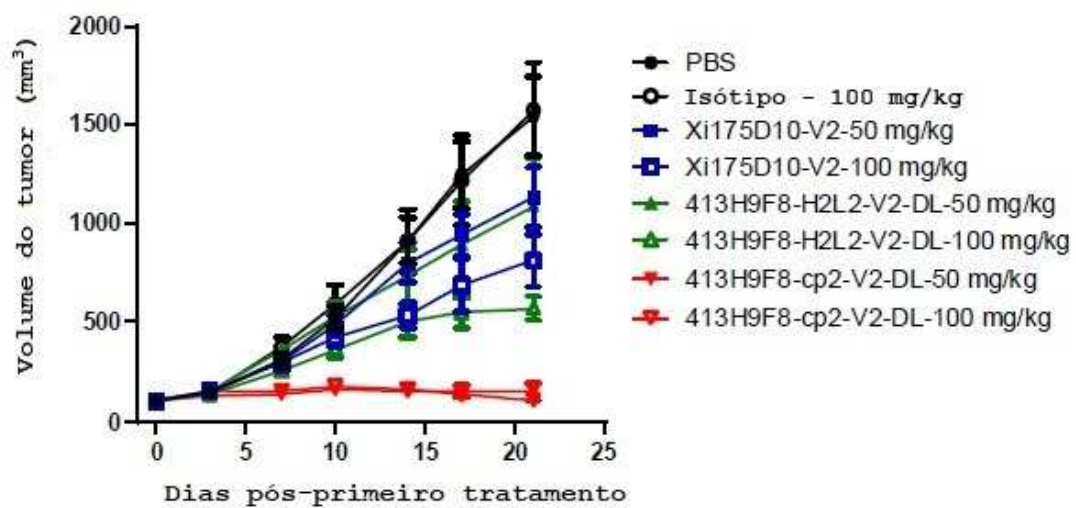


FIG. 35A

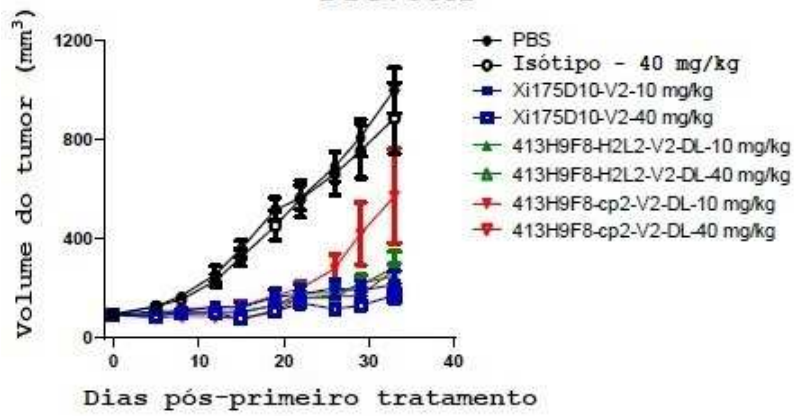


FIG. 35B

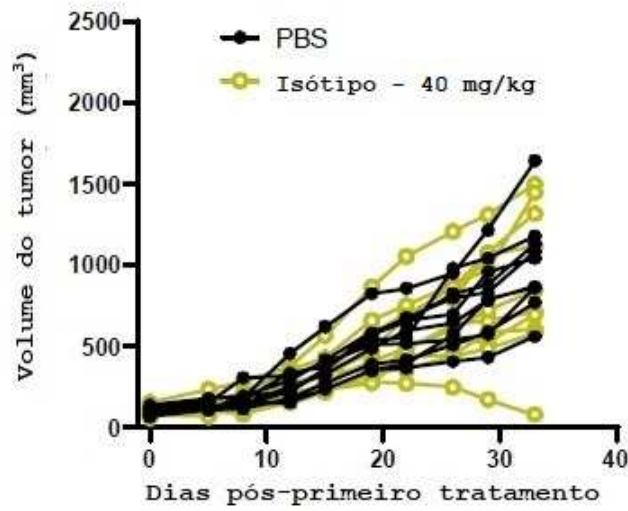


FIG. 35C

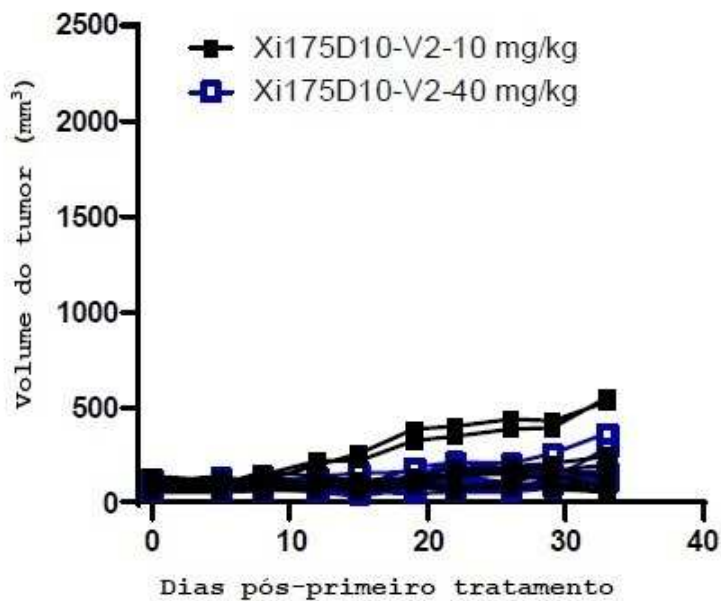


FIG. 35D

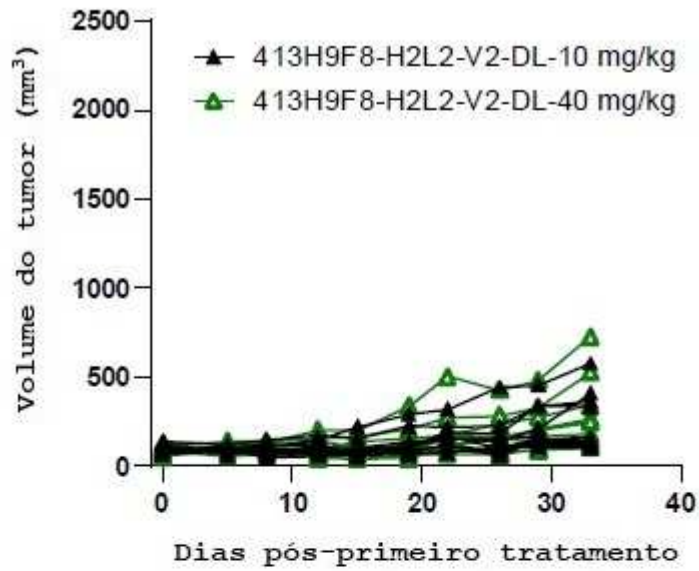


FIG. 35E

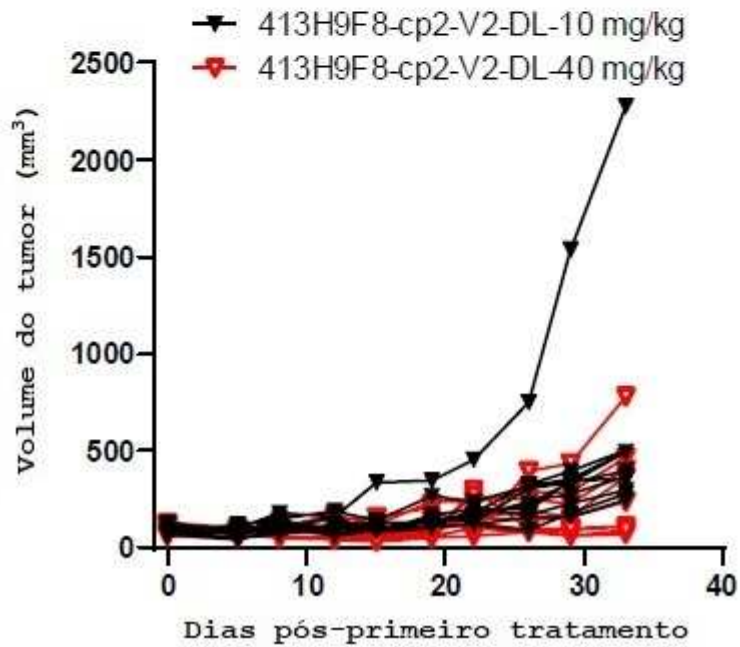
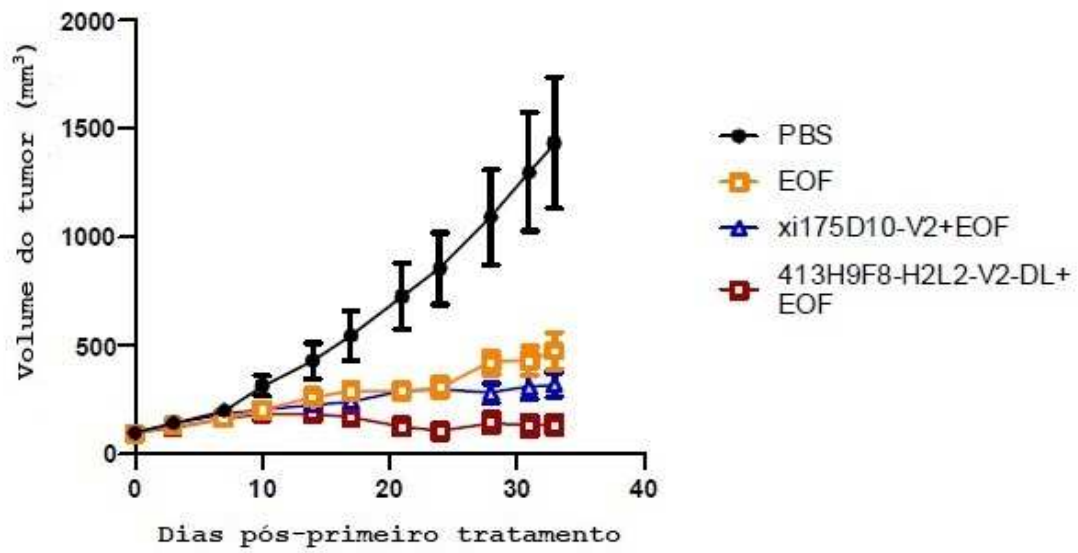


FIG. 36



RESUMO

**ANTICORPOS ANTI-CLAUDINA E USOS DESTES**

São revelados nesse relatório descritivo anticorpos anti-Claudina 18.2 e composições farmacêuticas que os compreendem. Em algumas modalidades, também são descritos nesse relatório descritivo métodos de tratamento de um indivíduo que possui um câncer com um anticorpo anti-Claudina 18.2 e métodos de indução de efeito de morte celular com um anticorpo anti-Claudina 18.2.