



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117799** (13) **C2**
(51) МПК (2018.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C07K 14/705** (2006.01)

A61P 35/00

A61K 39/395 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2012 07057	(72) Винахідник(и):	Сахін Угур (DE),
(22) Дата подання заявки:	11.11.2010		Тюречі Езлем (DE),
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.10.2018		Козловські Міхаель (DE),
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09014136.7, 61/260,202, 10006956.6, 61/361,618		Вальтер Корден (DE),
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11.11.2009, 11.11.2009, 06.07.2010, 06.07.2010		Вйоль Штефан (DE),
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, US, EP, US	(73) Власник(и):	ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ,
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.09.2012, Бюл.№ 18		Freiligrathstrasse 12, 55131 Mainz, Germany (DE),
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.10.2018, Бюл.№ 19		ИОХАННЕС ГУТЕНБЕРГ - УНІВЕРСИТЕТ МАЙНЦ,
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2010/006888, 11.11.2010		Saarstrasse 21, 55128 Mainz, Germany (DE)
		(74) Представник:	Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
		(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009087978 A1, 16.07.2009 CA 2379661 A1, 28.09.2003 WO 2009025759 A1, 26.02.2009

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЕ АНТИТІЛО, СПЕЦИФІЧНЕ ДО КЛАУДИНУ 6 (CLDN6)**(57) Реферат:**

Винахід стосується моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з CLDN6, і де антитіло не зв'язується з CLDN9, з'єднаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN9, гібридами, що продукує вказане антитіло, кон'югата, що його містить, фармацевтичної композиції, способу інгібування росту клітини, яка експресує CLDN6, способу знищення клітини, що експресує CLDN6, способу лікування або запобігання хворобі або порушенню у суб'єкта, при яких задіяна клітина, яка експресує CLDN6, та способу інгібування метастатичного порушення клітини, що експресує CLDN6.

UA 117799 C2

Протягом останнього десятиліття в клінічну практику для лікування раку успішно впроваджені антитіла, які є найбільш перспективними терапевтичними засобами в онкології. Лікування раку, яке ґрунтується на використанні антитіл має вищу специфічність і дає менше побічних ефектів в порівнянні з традиційними лікарськими засобами. Причина полягає в тому, що антитіла точно відрізняють нормальні від неопластичних клітин, а також в тому, що спосіб їх впливу ґрунтується на менш токсичних імунологічних протипухлинних механізмах дії, таких як активація комплементу і рекрутування цитотоксичних імунних клітин.

Клаудини є інтегральними мембранними білками, розташованими в місцях щільного контакту епітелію і ендотелію. Відомо, що клаудини мають чотири трансмембранних сегменти з двома позаклітинними петлями, при цьому N і C-кінці розташовуються в цитоплазмі. Родина трансмембранних білків клаудинів (CLDN) грає вирішальну роль в збереженні епітеліальних і ендотеліальних щільних контактів, а також в підтримці цитоскелету і в сигнальній системі клітини. Різниця в експресії цих білків пухлинними і нормальними клітинами, на додачу до їх мембранної локалізації, робить їх привабливою метою для імунотерапії раку, а застосування при лікуванні раку терапевтичних засобів на основі антитіл для націлювання на CLDN обіцяє високий рівень терапевтичної специфічності.

Проте клінічне застосування терапевтичних засобів, націлених на CLDN, стикається з деякими перешкодами. При повсюдній експресії CLDN в організмі і вирішальній ролі CLDN в збереженні щільних контактів, для того, щоб збільшити до межі специфічність лікування і звести до мінімуму загальну токсичність, потрібна специфічність мішені для терапевтичних засобів, націлених на CLDN.

WO 2009/087978 має відношення до анти-CLDN6 антитіл та їх застосування як протипухлинних засобів. Зокрема, описуються моноклональні антитіла, позначені AB3-1, AE1-16, AE49-11 і AE3-20. Проте жодне з цих антитіл не було специфічним до CLDN6, як показано за допомогою FACS-аналізу в прикладі 5. Антитіло AE3-20 вступало в реакцію з CLDN9, тоді як антитіла AE1-16 і AE49-11 показували значну здатність вступати в реакцію з CLDN9 і також вступали в реакцію з CLDN4. Зв'язок антитіла AB3-1 з CLDN6 був таким же сильним, як його зв'язок з CLDN9. У Прикладі 7 описано, що при введенні антитіл AE49-11 на мишачій моделі пухлини спостерігається тенденція до інгібування зростання пухлини і збільшення тривалості життя. Проте зважаючи на неспецифічність використаного антитіла, залишається неясним, чи є описані ефекти результатом зв'язування антитіла з CLDN6.

Таким чином, до цих пір не описане CLDN6-специфічне антитіло, яке селективно зв'язується з поверхнею клітин, які експресують CLDN6. Проте, таке специфічне антитіло було б необхідне для терапевтичних підходів на основі антитіл, які використовують CLDN6 як мішень.

Вирівнювання послідовностей CLDN3, CLDN4, CLDN6 і CLDN9, показане на Фіг. 1, ілюструє, що існує високий ступінь консервативності CLDN6 у відношенні до інших білків клаудинів. Ця висока гомологія CLDN6 з іншими білками клаудинами, зокрема CLDN9 і CLDN4, і той факт, що WO 2009/087978 виявився не в змозі забезпечити CLDN6-специфічні антитіла, показують, що може бути неможливим отримання антитіл, які специфічно зв'язуються з CLDN6.

Розкриття винаходу

Експериментальні результати, розкриті в описі, підтверджують, що CLDN6 експресується в різних ракових клітинах людини, тоді як експресія в нормальних тканинах обмежується плацентою.

Крім того, даний винахід вперше описує успішне отримання CLDN6-специфічних антитіл, здатних зв'язуватися з поверхнею інтактних клітин, які експресують CLDN6. FACS-аналіз інтактних клітин, які експресують CLDN6, показав специфічне зв'язування анти-CLDN6 антитіл, тоді, як з клітинами, які експресують інші білки-клаудини, зокрема, CLDN3, CLDN4 і CLDN9, або з клітинами, які не експресують будь-які з цих CLDN-білків, зв'язок не спостерігався. Таким чином, даний винахід несподівано показує, що може бути отримане антитіло, яке здійснює специфічну взаємодію антиген-антитіло з CLDN6 на поверхні клітин, які експресують CLDN6, але яке практично не демонструє взаємодії антиген-антитіло з іншими високгомологічними клаудинами.

Загалом, даний винахід пропонує антитіла, придатні як терапевтичні засоби, для лікування і/або запобігання хворобам, які мають відношення до клітин, які експресують CLDN6, і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, включаючи пухлинні захворювання, зокрема рак, наприклад, рак яєчника, зокрема аденокарциному яєчника і тератокарциному яєчника, рак легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легень і аденокарциному, рак шлунку, рак молочної залози, рак печінки, рак підшлункової залози, рак шкіри, зокрема базальноклітинну карциному і плоскоклітинну карциному, злоякісну меланому, рак голови і шиї,

зокрема злоякісну плеоморфну аденому, саркому, зокрема синовіальну саркому і карциносаркому, рак жовчної протоки, рак сечового міхура, зокрема перехідно-клітинну карциному і папілярний рак, рак нирки, зокрема нирковоклітинний рак, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, рак товстої кишки, рак тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, ембріональну карциному яєчка, плацентарну хоріокарциному, рак шийки матки, рак яєчка, зокрема семіному яєчка, тератому яєчка і ембріональний рак яєчка, рак матки, герміному, таку як, тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинну пухлину яєчка, та їх метастатичні форми.

У одному аспекті винахід має відношення до антитіла, здатного зв'язуватися з CLDN6, зв'язаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN6. Бажано антитіло практично нездатне зв'язуватися з CLDN9, пов'язаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN9. Бажано антитіло практично нездатне зв'язуватися з CLDN4, зв'язаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN4, і/або практично нездатне зв'язуватися з CLDN3, зв'язаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN3. Найкраще, антитіло практично нездатне зв'язуватися з CLDN-білком, відмінним від CLDN6, зв'язаним з поверхнею клітини, яка експресує вказаний CLDN-білок, і є специфічним для CLDN6. Бажано вказана клітина, яка експресує вказаний CLDN-білок, є інтактною клітиною, зокрема непроникною клітиною (клітиною з непорушеною проникністю мембрани), і вказаний CLDN-білок, зв'язаний з поверхнею клітини, має нативну, тобто неденатуровану конформацію. Краще антитіло здатне зв'язуватися з одним або більш епітопами CLDN6, в їх нативній конформації.

У одному варіанті здійснення антитіло здатне зв'язуватися з епітопом, розташованим на позаклітинній ділянці CLDN6, причому вказана позаклітинна ділянка CLDN6 бажано містить будь-яку амінокислотну послідовність з числа SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15, бажано амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7, краще амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. Краще антитіло здатне зв'язуватися з епітопом, розташованим в межах будь-якої амінокислотної послідовності з числа SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15, бажано амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7.

У одному варіанті здійснення антитіло здатне зв'язуватися з CLDN6 шляхом взаємодії, щонайменше, з однією, бажано більше ніж однією, наприклад, 2, 3, 4 або 5, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Thr33, Phe35, Gly37, Ser39, Ile40 і Leu151, бажано шляхом взаємодії, щонайменше, з однією, бажано більше ніж однією, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Thr33, Phe35, Gly37, Ser39 і Ile40, краще шляхом взаємодії, щонайменше, з однією, бажано більше ніж однією, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Phe35, Gly37, Ser39 і Ile40, або яка складається з Thr33, Phe35, Gly37 і Ser39, і зокрема, шляхом взаємодії, щонайменше, з однією, бажано більше ніж однією, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Phe35, Gly37 і Ser39. Краще антитіло не взаємодіє з однією або більше, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Glu154, Ala155, Arg158 і Gly161, і бажано не взаємодіє з однією або більше, бажано зі всіма амінокислотами, вибраними з групи, яка складається з Arg158 і Gly161.

Взаємодія між антитілом і CLDN6, зокрема в його нативній конформації, може бути дослідженою за допомогою скануючого аланіном мутагенезу амінокислот. Мутанти CLDN6 можна визначити за їх здатністю зв'язуватися із специфічними моноклональними антитілами. Зменшене зв'язування специфічного моноклонального антитіла з CLDN6-мутантом означає, що амінокислота, яка зазнала мутації (видозмінена), є важливим зв'язуючим залишком. Зв'язок можна проаналізувати, наприклад, за допомогою проточної цитометрії.

У одному варіанті здійснення антитіло отримують способом, який передбачає стадію імунізації тварини пептидом, який має будь-яку амінокислотну послідовність з поміж SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15, бажано амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7, або імунологічно еквівалентним пептидом або нуклеїновою кислотою або клітиною-господарем, яка експресує вказаний пептид.

У різних варіантах здійснення CLDN6, з яким антитіло здатне зв'язуватися, має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8. Особливо бажано, щоб антитіло було здатне зв'язуватися з CLDN6, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і здатне зв'язуватися з CLDN6, який має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який містить, щонайменше, одну, бажано дві, краще всі три CDR-послідовності важкого ланцюга

антитіла, вибрані з поміж SEQ ID NO: 34, 36, 38 і 40 або їх варіанту. У вищезазначених послідовностях важкого ланцюга антитіла, приведених на Фіг. 25, CDR-послідовності помічені прямокутником.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, де Xaa1 є будь-якою амінокислотою, бажано ароматичною амінокислотою, краще Phe або Tyr, найкраще Tyr, Xaa2 є будь-якою амінокислотою, бажано ароматичною амінокислотою, краще Phe або Tyr, найкраще Tyr, і Xaa3 є будь-якою амінокислотою, бажано Leu або Phe, краще Leu. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, де Xaa1, Xaa2 і Xaa3 є, як описано вище. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, де Xaa1, Xaa2 і Xaa3 є таким, як описано вище. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, де Xaa1, Xaa2 і Xaa3 є таким, як описано вище.

У одному варіанті здійснення антитіло згідно вищенаведеним варіантам здійснення містить важкий ланцюг антитіла, який включає послідовність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 47 або її варіантів і/або CDR2 послідовність відповідно до SEQ ID NO: 48 або її варіантів.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, який включає послідовність важкого ланцюга, вибрану з поміж SEQ ID NO: 34, 36, 38 і 40 або їх варіантів.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить легкий ланцюг, який містить, щонайменше, одну, бажано дві, краще всі три CDR-послідовності легкого ланцюга антитіла, вибрані з поміж SEQ ID NO: 35, 37, 39 і 41 або їх варіантів. У вищезазначених послідовностях важкого ланцюга антитіла, приведені на Фіг. 26 CDR-послідовності, помічені прямокутником.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить легкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, де Xaa1 є будь-якою амінокислотою, бажано Ser або Asn, найкраще Ser, Xaa2 є будь-якою амінокислотою, бажано Tyr, Ser, Ile, Asn або Thr, краще Tyr, Ser, або Asn, найкраще Asn, і Xaa3 є будь-якою амінокислотою, бажано Ser або Tyr, краще Tyr. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить легкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, де Xaa1, Xaa2 і Xaa3 є таким, як визначено вище. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить легкий ланцюг, який включає CDR3 послідовність Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, де Xaa1, Xaa2 і Xaa3 є такими, як визначено вище. У одному варіанті здійснення антитіло, яке відповідає вищенаведеним варіантам здійснення містить легкий ланцюг антитіла, який включає послідовність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 52 або її варіант і/або CDR2 послідовність відповідно до SEQ ID NO: 53 або її варіант.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить легкий ланцюг, який містить послідовність легкого ланцюга, вибрану з поміж SEQ ID NO: 35, 37, 39 і 41 або їх варіантів.

У різних варіантах здійснення антитіло запропоноване винаходом містить важкий ланцюг, як обговорювалося вище, і легкий ланцюг, який також обговорювався вище.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить:

(i) важкий ланцюг антитіла, який містить, щонайменше, одну, бажано дві, краще всі три CDR-послідовності послідовності важкого ланцюга антитіла SEQ ID NO: x, або їх варіант, і

(ii) легкий ланцюг антитіла, який містить, щонайменше, одну, бажано дві, краще всі три CDR-послідовності послідовності легкого ланцюга антитіла SEQ ID NO: x+1, або їх варіант; де x вибирають з поміж 34, 36, 38 і 40.

CDR-послідовності у вищезазначених послідовностях важкого ланцюга антитіла і послідовностях легкого ланцюга антитіла, приведених на Фіг. 25 і Фіг. 26, відповідно, помічені прямокутником.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить:

(i) важкий ланцюг антитіла, який містить CDR3 послідовність, вибрану з групи, яка складається з Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp і Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, де Xaa1 є будь-якою амінокислотою, бажано ароматичною амінокислотою, краще Phe або Tyr, найкраще Tyr, Xaa2 є будь-якою амінокислотою, бажано ароматичною амінокислотою, краще Phe або Tyr, найкраще Tyr, і Xaa3 є будь-якою амінокислотою, бажано Leu або Phe, краще Leu, і

(ii) легкий ланцюг антитіла, який містить CDR3 послідовність, вибрану з групи, яка

складається з Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, де Xaa1 є будь-якою амінокислотою, бажано Ser або Asn, найкраще Ser, Xaa2 є будь-якою амінокислотою, бажано Tyr, Ser, He, Asn або Thr, краще Tyr, Ser або Asn, найкраще Asn, і Xaa3 є будь-якою амінокислотою, бажано Ser або Tyr, краще Tyr.

5 У одному варіанті здійснення антитіло згідно вищенаведеним варіантам здійснення містить (i) важкий ланцюг, який включає послідовність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 47 або її варіантів і/або послідовність CDR2 відповідно до SEQ ID NO: 48 або її варіантів і/або (ii) легкий ланцюг, який включає послідовність CDR1 відповідно до SEQ ID NO: 52 або її варіантів і/або CDR2 послідовність відповідно до SEQ ID NO: 53 або її варіантів.

10 У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом містить:

(i) важкий ланцюг антитіла, який містить послідовність важкого ланцюга SEQ ID NO: x або її варіант, і

(ii) легкий ланцюг антитіла, який містить послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO: x+1 або її варіант;

15 де x вибирають з поміж 34, 36, 38 і 40.

У кращих варіантах здійснення антитіло проявляє одне або більше із наступних дій: (i) знищення клітин, які експресують CLDN6, (ii) інгібування проліферації клітин, які експресують CLDN6, (iii) інгібування колонієутворення клітин, які експресують CLDN6, (iv) опосередковані ремісії, тобто зменшення розміру, бажано повні ремісії, тобто повне зникнення розвинутих пухлин, (v) запобігання утворенню або повторному утворенню пухлин і (vi) інгібування метастазування клітин, які експресують CLDN6. Відповідно, антитіло може використовуватися для отримання одного або більше з поміж перерахованого вище, зокрема, при введенні пацієнтові. Таке знищення клітин і/або інгібування однієї або більше за функцій клітин може використовуватися з терапевтичною метою, як описано тут. Зокрема, знищення клітин, інгібування проліферації клітин і/або інгібування колонієутворення клітин може використовуватися для лікування або запобігання захворюванню на рак, включаючи метастази раку. Інгібування проліферації, колонієутворення і/або метастазування клітин може використовуватися, зокрема, для лікування або запобігання метастазам раку і метастатичного поширення ракових клітин. Краще антитіло запропоноване винаходом опосередковує знищення клітин, викликаючи лізис, опосередкований комплементзалежною цитотоксичністю (CDC), лізис, опосередкований антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC), апоптоз, гомотипічну адгезію і/або фагоцитоз, бажано, викликаючи CDC-опосередкований лізис і/або ADCC-опосередкований лізис. Проте даний винахід також включає варіанти здійснення, в яких антитіло діє описаним тут чином, знищуючи клітини і/або інгібуючи одну або більше функцій клітин, наприклад, клітинну проліферацію і/або колонієутворення, без індукції лізису, опосередкованого комплементзалежною цитотоксичністю (CDC), лізису, опосередкованого антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC), апоптоз, гомотипічну адгезію і/або фагоцитоз. Наприклад, антитіло запропоноване винаходом також може діяти просто шляхом зв'язування з CLDN6 на клітинній поверхні, таким чином, наприклад, зупиняючи проліферацію клітин. У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом не викликає CDC-опосередкований лізис клітин.

Бажано ADCC-опосередкований лізис клітин відбувається у присутності ефektorних клітин, які в окремих варіантах здійснення вибирають з групи, яка складається з моноцитів, моноклеарних клітин, NK-клітин і PMN (поліморфоядерних нейтрофілів), а фагоцитоз здійснюється макрофагами.

Активність, пов'язану з інгібуванням або зменшенням проліферації клітин, які експресують CLDN6, бажано ракових клітин, можна визначити *in vitro* шляхом визначення проліферації клітин, які експресують CLDN6 за допомогою методу, який передбачає використання бромдезоксидіуридину (5-бром-2-дезоксидіуридин, BRDU). BRDU є синтетичним нуклеозидом, який є аналогом тимідину, який може включатися в новосинтезовану ДНК клітин, які відтворюються шляхом клітинного ділення (під час S-фази клітинного циклу), заміщаючи тимідин під час реплікації ДНК. Виявлення включеної хімічної речовини, наприклад, за допомогою антитіл, специфічних до BRDU, вкаже на клітини, в яких відбувається активне відтворення своєї ДНК.

Активність, пов'язану з інгібуванням або зменшенням колонієутворення клітин, які експресують CLDN6, бажано ракових клітин, можна визначити *in vitro* за допомогою дослідження колонієутворення. Оцінка здатності утворювати колонії є мікробіологічною методикою для вивчення ефективності дії окремих речовин на виживання і проліферацію клітин. Ця методика часто використовується в лабораторіях, які вивчають рак, для визначення дії лікарських препаратів або опромінювання на проліферуючі пухлинні клітини. Експеримент включає три основні етапи: (i) обробку зразка клітин, зокрема ракових клітин, (ii) висівання

клітин в посудину для культивування та (iii) етап росту клітин. Отримані колонії фіксують, фарбують і підраховують. Утворення колоній має велике значення при утворенні метастазів, якщо окремі клітини пухлин проникають в органи. Інгібуюча активність антитіл показує їх здатність пригнічувати утворення метастазів. Антитіла, що продемонстрували активність, пов'язану з інгібуванням або зменшенням колонієутворення, при дослідженні методом колонієутворення, є зокрема придатними для лікування або запобігання метастазам і метастатичному поширенню ракових клітин, зокрема, згаданих в описі видів раку.

У кращих варіантах здійснення антитіло проявляє одну або більше імунних ефекторних функцій відносно клітин, які несуть CLDN6, в нативній конформації, при цьому одну або більше імунних ефекторних функцій бажано вибирають з групи, яка складається з комплементзалежної цитотоксичності (CDC), антитілозалежної клітинної цитотоксичності (ADCC), індукції апоптозу та інгібування проліферації, бажано ефекторними функціями є ADCC і/або CDC.

Бажано вказана одна або більше активностей або одна або більше імунних ефекторних функцій, які проявляються вказаним антитілом, викликаються зв'язком вказаного антитіла з CLDN6, бажано з епітопом, розташованим на позаклітинній ділянці CLDN6, причому вказана позаклітинна ділянка CLDN6 бажано містить будь-яку амінокислотну послідовність з числа SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15, бажано амінокислотну послідовність SEQ ID: 6 або SEQ ID NO: 7, краще амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

Згідно винаходу клітина, яка експресує CLDN6, бажано характеризується зв'язком CLDN6 з клітинною поверхнею. Клітина, яка експресує CLDN6, або клітина, яка несе CLDN6, в нативній конформації, бажано є пухлинною клітиною, такою як ракова клітина, бажано клітиною злоякісної пухлини, вибраної з групи, яка складається з раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника і тератокарциноми яєчника, раку легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легень і аденокарциноми, раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми і плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, раку голови і шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, зокрема синовіальної саркоми і карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми і папілярного раку, раку нирок, зокрема нирковоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциноми тонкої кишки і аденокарциноми клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка і ембріонального раку яєчка, раку матки, герміноми, такої як, тератокарцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм.

Антитіло запропоноване винаходом може бути об'єднане з одним або більше терапевтичним ефекторним фрагментом (частинкою, молекулою), наприклад, радіоактивною міткою, цитотоксином, терапевтичним ферментом, агентом, який викликає апоптоз тощо, для того, щоб забезпечити прицільну цитотоксичність, тобто знищення пухлинних клітин.

У одному варіанті здійснення антитіло запропоноване винаходом (i) зв'язується з клітинами, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, і (ii) не зв'язується з клітинами, які не експресують CLDN6 і які не характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Антитіло запропоноване винаходом бажано (i) опосередковує знищення і/або інгібує проліферацію клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, і (ii) не опосередковує знищення і/або не інгібує проліферацію клітин, які не експресують CLDN6 і які не характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею.

У окремих кращих варіантах здійснення антитіло запропоноване винаходом зв'язується з нативними епітопами CLDN6, присутніми на поверхні живих клітин, такими як SEQ ID NO: 6 або 7. У додаткових кращих варіантах здійснення антитіло запропоноване винаходом є специфічним відносно ракових клітин, які експресують CLDN6 і не зв'язується з раковими клітинами, які не експресують CLDN6.

Антитіла запропоновані винаходом можна отримати від різних видів тварин, включаючи, але не обмежуючись названими, мишей, щурів, кроликів, морських свинок і людину. Антитіла запропоновані винаходом також включають химерні молекули, в яких константна область антитіла, отримана від одного виду, бажано людини, об'єднана з ділянкою зв'язування антигену, отриманою від іншого виду. Більш того, антитіла запропоновані винаходом включають гуманізовані молекули, в яких антигензв'язуючі ділянки, отримані від виду, який не є людиною, об'єднуються з константними і каркасними ділянками людського походження.

Антитіла запропоновані винаходом включають поліклональні і моноклональні антитіла і

включають антитіла до IgG2a (наприклад, IgG2a, κ , λ), IgG2b (наприклад, IgG2b, κ , λ), IgG3 (наприклад, IgG3, κ , λ) і IgM. Проте, також розглядаються інші ізотипи Антитіл запропонованих даним винаходом, включаючи IgG1, IgA1, IgA2, секреторні IgA, IgD і IgE антитіла. Антитіла можуть бути цілими антитілами або їх антигензв'язуючими фрагментами, включаючи, наприклад, Fab, F(ab')₂, Fv, одноланцюгові фрагменти або біспецифічні антитіла Fv. Крім того, антигензв'язуючі фрагменти включають домен зв'язування імуноглобулінових гібридних білків, який містить (i) поліпептид-зв'язуючий домен (такий як варіабельна область важкого ланцюга або варіабельна область легкого ланцюга), який з'єднується з імуноглобуліновою шарнірною ділянкою поліпептиду, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, сполучену з шарнірною ділянкою і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, сполучену з CH₂ константною областю. Такі домени зв'язування імуноглобулінових гібридних білків додатково розкриваються в US 2003/0118592 і US 2003/0133939.

Антитіло запропоноване винаходом бажано є моноклональним, химерним людським або гуманізованим антитілом або фрагментом антитіла. Антитіла запропоновані винаходом включають повністю людські антитіла. Такі антитіла можуть бути отримані в трансгенній тварині, яка не є людиною, наприклад, в трансгенній миші, здатній продукувати багато ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN6 за допомогою проведення V-D-J рекомбінації і перемикання ізотипу. Така трансгенна тварина також може бути трансгенним кроликом для отримання поліклональних антитіл, наприклад, розкритих в US 2003/0017534.

Бажано антитіла запропоновані даним винаходом відділяються від CLDN6 з рівноважною константою дисоціації (K_D) приблизно 1-100 нМ або менше. Бажано антитіла запропоновані винаходом не реагують перехресно із спорідненими антигенами клітинної поверхні і таким чином не інгібують їх функцію.

У кращих варіантах здійснення антитіла запропоновані даним винаходом можуть характеризуватися однією або більше із наступних властивостей:

- а) специфічністю до CLDN6;
- б) спорідненістю зв'язування з CLDN6 близько 100 нМ або менше, бажано близько 5-10 нМ або менше і краще близько 1-3 нМ або менше
- в) здатністю викликати CDC клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- г) здатністю інгібувати ріст клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- д) здатністю викликати апоптоз клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- е) здатністю викликати гомотипічну адгезію клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- ж) здатністю викликати ADCC клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею у присутності ефektorних клітин;
- з) здатністю збільшувати виживання суб'єкта, який має пухлинні клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- и) здатністю знищувати клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею;
- й) здатністю агрегувати CLDN6 на поверхні живих клітин.

Краще антитіло, описане тут, є антитілом, продуктованим клітиною гібридомною або отриманим від клітини гібридомною, депонованою в DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Німеччина) і має одне з наступних позначень і реєстраційних номерів:

1. GT512muMAB 59A, реєстраційний номер DSM ACC3067, депонована 21 червня 2010;
2. GT512muMAB 60A, реєстраційний номер DSM ACC3068, депонована 21 червня 2010;
3. GT512muMAB 61D, реєстраційний номер DSM ACC3069, депонована 21 червня 2010;
4. GT512muMAB 64A, реєстраційний номер DSM ACC3070, депонована 21 червня 2010;
5. GT512muMAB 65A, реєстраційний номер DSM ACC3071, депонована 21 червня 2010;
6. GT512muMAB 66B, реєстраційний номер DSM ACC3072, депонована 21 червня 2010;
7. GT512muMAB 67A, реєстраційний номер DSM ACC3073, депонована 21 червня 2010;
8. GT512muMAB 55A, реєстраційний номер DSM ACC3089, депонована 31 серпня 2010; або
9. GT512muMAB 89A, реєстраційний номер DSM ACC3090, депонована 31 серпня 2010.

Антитіла запропоновані винаходом позначаються в описі шляхом посилання на позначення антитіла і/або шляхом посилання на клон, який продукує антитіло, наприклад, muMAB 59A.

Крім того, більш бажаними антитілами є антитіла, які мають специфічність антитіл, продуктованих гібридомною або отриманих від описаної вище гібридомною, і зокрема, антитіла, які містять антигензв'язуючу ділянку або антигензв'язуючий центр, зокрема варіабельну ділянку,

ідентичну або високогомологічну до ділянки антитіла, продукowanego або отриманого від вищеописаної гібридоми. Передбачається, що кращими антитілами є антитіла, які мають CDR ділянки або ідентичні або високогомологічні до ділянок антитіл, продукowanych або отриманих від описаної вище гібридоми. Під "високогомологічним" слід розуміти, що можуть бути зроблені від 1 до 5, бажано від 1 до 4, наприклад від 1 до 3, або 1 або 2 замін в кожній CDR ділянці. Особливо бажаними є химерні і гуманізовані форми антитіл, продукowanych гібридомною або отримані від неї.

Таким чином, антитіло запропоноване винаходом можна вибрати з групи, яка складається з (i) антитіла, продукowanego або отриманого від клону, депонованого під реєстраційним номером DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A) або DSM ACC3090 (GT512muMAB 89 A), (ii) антитіла, яке є химерною або гуманізованою формою антитіла згідно (i), (iii) антитіла, яке має специфічність антитіла згідно (i), і (iv) антитіла, яке містить антигензв'язуючу ділянку або антигензв'язуючий центр антитіла згідно (i). Антигензв'язуюча ділянка або антигензв'язуючий центр антитіла згідно (i) може містити варіабельну ділянку антитіла згідно (i).

Даний винахід також має відношення до клітини, такої як клітина гібридоми, яка продукує антитіло, як описано тут.

Кращими клітинами гібридоми є ті, що депоновані в DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Німеччина) і мають одне з наступних позначень і реєстраційних номерів:

1. GT512muMAB 59A, реєстраційний номер DSM ACC3067, депонована 21 червня 2010;
2. GT512muMAB 60A, реєстраційний номер DSM ACC3068, депонована 21 червня 2010;
3. GT512muMAB 61D, реєстраційний номер DSM ACC3069, депонована 21 червня 2010;
4. GT512muMAB 64A, реєстраційний номер DSM ACC3070, депонована 21 червня 2010;
5. GT512muMAB 65A, реєстраційний номер DSM ACC3071, депонована 21 червня 2010;
6. GT512muMAB 66B, реєстраційний номер DSM ACC3072, депонована 21 червня 2010;
7. GT512muMAB 67A, реєстраційний номер DSM ACC3073, депонована 21 червня 2010;
8. GT512muMAB 55A, реєстраційний номер DSM ACC3089, депонована 31 серпня 2010; або
9. GT512muMAB 89A, реєстраційний номер DSM ACC3090, депонована 31 серпня 2010.

Анти-CLDN6 антитіла запропоновані даним винаходом можуть утворювати похідні, зв'язуватися або спільно експресуватися з іншими специфічностями зв'язування. У окремому варіанті здійснення винахід пропонує біспецифічну або мультиспецифічну молекулу, яка містить, щонайменше, першу специфічність зв'язування для CLDN6 (наприклад, анти-CLDN6-антитіло або його міметик) і другу специфічність зв'язування для ефекторної клітини, наприклад, специфічність зв'язування для рецептора Fc (наприклад, Fc-гамма-рецептора, такого як Fc-гамма-RI, або будь-якого іншого Fc-рецептора) або Т-клітинного рецептора, наприклад, CD3.

Відповідно, даний винахід включає біспецифічні і мультиспецифічні молекули, які зв'язуються і з CLDN6 і з Fc-рецептором або Т-клітинним рецептором, наприклад, CD3. Прикладами Fc-рецепторів є рецептор IgG, Fc-гамма рецептор (FcγR), такий як FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) і FcγRIII (CD16). Інші Fc-рецептори, такі як рецептори IgA (наприклад, FcαRI), також можуть бути метою. Рецептор Fc бажано розташовується на поверхні ефекторної клітини, наприклад, моноцита, макрофага або активованої мононуклеарної клітини. У кращому варіанті здійснення біспецифічні і мультиспецифічні молекули зв'язуються з Fc-рецептором на ділянці, відмінній від імуноглобулінової Fc (наприклад, IgG або IgA) ділянки зв'язування рецептора. Отже, зв'язування біспецифічних і мультиспецифічних молекул не блокується фізіологічними рівнями імуноглобулінів.

У іншому аспекті анти-CLDN6 антитіла запропоновані винаходом є похідними, пов'язаними з або спільно експресованими з іншими функціональними молекулами, наприклад, іншим пептидом або білком (наприклад, Fab1 фрагментом). Наприклад, антитіло запропоноване винаходом може бути функціонально пов'язаним (наприклад, за допомогою хімічної зв'язки, генетичного злиття, нековалентного зв'язку або іншого способу) з однією або більше іншими молекулярними частинками, наприклад, іншим антитілом (наприклад, для отримання біспецифічного або мультиспецифічного антитіла), цитотоксином, клітинним лігандом або антигеном (наприклад, щоб отримати імунокон'югат, такий як імунотоксин). Антитіло запропоноване даним винаходом може бути зв'язане з іншими терапевтичними частинками, наприклад, радіоізотопом, невеликою молекулою протипухлинного лікарського засобу, рекомбінантним цитокином або хемокином. Відповідно, даний винахід включає цілий ряд кон'югатів антитіл, біспецифічні і мультиспецифічні молекули і гібридні білки, які зв'язуються з

клітинами, які експресують CLDN6, і/або з клітинами, які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, і які можна використовувати для націлювання інших молекул на ці клітини.

В цілому, для цілей даного винаходу всі похідні антитіл, такі як кон'югати антитіл, біспецифічні і мультиспецифічні молекули і гібридні білки, описані тут, охоплюються терміном "антитіло".

У додатковому аспекті винахід також передбачає CLDN6-зв'язуючі білки, отримані з доменів, які не є імуноглобуліновими, зокрема одноланцюгові білки. Такі зв'язуючі білки і способи їх отримання описані, наприклад, в роботі Binz et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23 (10): 1257-1268, включений до опису як посилання. Слід розуміти, що приведена в описі ідея відносно імуноглобуліну або похідних від імуноглобуліну зв'язуючих молекул, відповідно також може бути застосована до зв'язуючих молекул, отриманих з неімуноглобулінових доменів. Зокрема, використовуючи такі зв'язуючі молекули, отримані з неімуноглобулінових доменів, можливо блокувати CLDN6 клітин, які експресують вказану мішень і які характеризуються зв'язуванням вказаної мішені з клітинною поверхнею, і таким чином, як розкрито в описі відносно антитіл запропонованих даним винаходом, здійснити терапевтичні ефекти, зокрема інгібування однієї або більше функцій клітин пухлин, розкритих в описі, наприклад, інгібування проліферації. Хоча не обов'язково, але можливо, таким неімуноглобуліновим зв'язуючим молекулам надати ефекторних функцій антитіл, наприклад, шляхом злиття з Fc ділянкою антитіл.

Даний винахід в цілому включає лікування і/або діагностування хвороб, зокрема пухлинних захворювань, шляхом "націлювання" на CLDN6, експресований клітинами і сполучений з поверхнею клітин. Ці способи забезпечують селективне виявлення і/або знищення таких клітин, тим самим зводячи до мінімуму шкідливі дії на нормальні клітини, які не експресують CLDN6 і які не характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Переважно хворобами для лікування і діагностування є хвороби, при яких задіяні клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, наприклад, пухлинні захворювання, зокрема ракові захворювання, такі як описані тут.

У одному аспекті винахід пропонує композиції, наприклад, фармацевтичні і діагностичні композиції/набори, які містять антитіло, або комбінацію антитіл запропонованих даним винаходом. Фармацевтична композиція запропонована винаходом може містити фармацевтично прийнятний носій і може необов'язково містити один або більше ад'ювантів, стабілізуючих речовин тощо. У окремому варіанті здійснення композиція включає комбінацію антитіл, які зв'язуються з різними епітопами, або які мають різні функціональні характеристики, наприклад, викликають CDC і/або ADCC і викликають апоптоз. У цьому варіанті здійснення винаходу антитіла можуть використовуватися в комбінації, наприклад, як фармацевтична композиція, яка містить два або більше анти-CLDN6 моноклональних антитіл. Наприклад, анти-CLDN6 антитіла, які мають різні, але комплементарні активності, можуть бути об'єднані в єдине лікування для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. У бажаному варіанті здійснення композиція включає анти-CLDN6 антитіло, яке опосередковує CDC, в комбінації з іншим анти-CLDN6 антитілом, яке викликає апоптоз. У іншому варіанті здійснення композиція включає анти-CLDN6 антитіло, яке опосередковує високоефективне знищення клітин-мішеней у присутності ефекторних клітин, в комбінації з іншим анти-CLDN6 антитілом, яке інгібує ріст клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею.

Даний винахід також включає одночасне або послідовне введення двох або більше анти-CLDN6 антитіл запропонованих даним винаходом, причому бажано, щонайменше, одне з вказаних антитіл є химерним анти-CLDN6 антитілом і, щонайменше, одне додаткове антитіло є людським анти-CLDN6 антитілом, при цьому антитіла зв'язуються з одним і тим же або з різними епітопами CLDN6. Краще химерне CLDN6 антитіло запропоноване винаходом вводиться першим, з подальшим введенням людського анти-CLDN6 антитіла запропонованого винаходом, причому людське анти-CLDN6 антитіло бажано вводиться протягом тривалого періоду часу, тобто як підтримуюча терапія.

Антитіла, кон'югати, біспецифічні/мультиспецифічні молекули і композиції даного винаходу можуть використовуватися у ряді способів інгібування росту клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, і/або селективного знищення клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, шляхом контакту клітин з ефективною кількістю антитіла, кон'югата, біспецифічної/мультиспецифічної молекули або композиції, так що зростання клітин інгібується і/або клітина знищується. У одному варіанті здійснення спосіб включає знищення клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею,

необов'язково у присутності ефекторних клітин, наприклад, шляхом CDC, апоптозу, ADCC, фагоцитозу або за допомогою комбінації двох або більше з цих механізмів. Клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, які можна інгібувати або знищити, використовуючи антитіла запропоновані винаходом, включають ракові клітини.

Антитіла, кон'югати, і біспецифічні/мультиспецифічні молекули і композиції запропоновані даним винаходом можна використовувати для лікування і/або запобігання цілому ряду хвороб, при яких задіяні клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, шляхом введення антитіл пацієнтам, які страждають на такі хвороби. Приклади хвороб, які можна лікувати (наприклад, поліпшити стан) або запобігти, включають, але не обмежуються названими, онкологічні хвороби. Приклади онкологічних хвороб, які можна лікувати і/або запобігти, включають злоякісні захворювання, такі як рак яєчника, зокрема аденокарциному яєчника і тератоканциному яєчника, рак легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легень і аденокарциному, рак шлунку, рак молочної залози, рак печінки, рак підшлункової залози, рак шкіри, зокрема базальноклітинну карциному і плоскоклітинну карциному, злоякісну меланому, рак голови і шиї, зокрема злоякісну плеоморфну аденому, саркому, зокрема синовіальну саркому і карциносаркому, рак жовчної протоки, рак сечового міхура, зокрема перехідно-клітинну карциному і папілярний рак, рак нирки, зокрема нирковоклітинний рак, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, рак товстої кишки, рак тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, ембріональну карциному яєчка, плацентарну хоріокарциному, рак шийки матки, рак яєчка, зокрема семіному яєчка, тератому яєчка і ембріональний рак яєчка, рак матки, герміному, таку як, тератоканциному або ембріональну карциному, зокрема ембріонально-клітинну пухлину яєчка та їх метастатичні форми.

У додатковому аспекті винахід має відношення до способу лікування або запобігання хворобі або порушенню, у яких залучені клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, який передбачає введення суб'єктові антитіла, кон'югата, біспецифічної/мультиспецифічної молекули або композиції винаходу. Бажано хвороба або порушення є хворобою, пов'язаною з пухлиною і в конкретних варіантах здійснення її вибирають з групи, яка складається з раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника і тератоканциноми яєчника, раку легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легень і аденокарциному, раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми і плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, раку голови і шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, зокрема синовіальної саркоми і карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми і папілярної раку, раку нирки, зокрема нирковоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка і ембріональної раку яєчка, раку матки, герміноми, такої як, тератоканцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм. Переважно на поверхні вказаних клітин експресується CLDN6.

Винахід передбачає застосування описаних тут засобів і композицій для профілактичного і/або терапевтичного лікування пухлинних хвороб, тобто для лікування пацієнта, який має пухлинне захворювання або який має ризик розвитку пухлинного захворювання. У одному аспекті винахід пропонує способи інгібування зростання пухлин, які передбачають введення одного або більше з поміж описаних тут засобів і композицій.

Бажано описані тут засоби і композиції вводяться у такий спосіб, що терапевтично активна субстанція не доставляється або практично не доставляється до тканини або органу, в якому клітини експресують CLDN6 і характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, тоді як тканина або орган вільні від пухлин, наприклад в тканину плаценти або плаценту. Для цього засобу і композиції, описані тут, вводяться місцево.

У одному аспекті винахід пропонує описане тут антитіло для застосування в описаних тут способах лікування. У одному варіанті здійснення винахід пропонує описану тут фармацевтичну композицію для застосування в описаних тут способах лікування.

У окремому варіанті здійснення винаходу суб'єкта, якому вводиться антитіло, додатково лікують за допомогою засобу хіміотерапії, опромінювання або засобу, який модулює, наприклад,

який підсилює або інгібує, експресію або активність Fc-рецептора, наприклад, Fc-гамма рецептора, такого як цитокін. Типові цитокіни для введення під час лікування включають гранулоцитарний колонієстимулюючий чинник (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий чинник (GM-CSF), інтерферон- γ (IFN- γ) і чинник некрозу пухлини (TNF).

5 Типові терапевтичні засоби включають, серед інших, протипухлинні засоби, такі як доксорубіцин, цисплатин, таксотер, 5-фторурацил, метотрексат, гемцитабін і циклофосфамід.

У наступному аспекті винахід має відношення до імунізації тварин, які не є людиною, наприклад, мишей, людським CLDN6 або його пептидним фрагментом, для отримання антитіл. Кращими пептидами для імунізації є пептиди, вибрані з групи, яка складається з SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15 та імунологічно еквівалентних пептидів.

Також як і трансгенні тварини, які не є людиною, тварини дикого типу можуть бути імунізовані очищеним або збагаченим препаратом CLDN6 антигену або його пептидним фрагментом і/або нуклеїновими кислотами і/або клітинами, які експресують CLDN6 або його пептидний фрагмент. Переважно трансгенна тварина, яка не є людиною, здатна продукувати багато ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN6 (наприклад, IgG, IgA і/або IgM) за допомогою проведення V-D-J рекомбінації і перемикання ізотипу. Перемикання ізотипу може відбуватися за допомогою, наприклад, класичного або некласичного перемикання ізотипу.

Відповідно, в ще одному аспекті винахід пропонує виділені з тварини, які не є людиною, В-клітини, як описано вище. Потім виділені В-клітини можна імунізувати шляхом злиття з іморталізованою клітиною для отримання джерела (наприклад, гібридами) антитіл запропонованих даним винаходом. Такі гібридами (тобто продукуючі антитіла запропоновані винаходом) також охоплюються рамками винаходу.

У додатковому аспекті даний винахід має відношення до методів діагностування, виявлення і моніторингу пухлинної хвороби, що включає встановлення і/або визначення кількості CLDN6 або клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, в біологічному зразку, узятим у пацієнта, за допомогою антитіла запропонованого винаходом. Біологічний зразок може бути узятий у пацієнта, який має пухлинне захворювання, або у якого підозрюють захворювання або який захворює або такого, у якого є ймовірність розвитку пухлинного захворювання.

У одному варіанті здійснення способу діагностування, виявлення або моніторингу пухлинної хвороби згідно винаходу біологічний зразок і/або контрольний/еталонний зразок походить з тканини або органу, які відповідають тканині або органу, який слід продіагностувати, виявити або проконтролювати щодо ураження пухлинним захворюванням, наприклад, злоякісною хворобою, яку слід діагностувати, виявити або проконтролювати, є карцинома яєчника, а біологічний зразок і/або контрольний/еталонний зразок є тканиною яєчника. Такі тканини і органи описуються тут, наприклад, у зв'язку з різними пухлинними захворюваннями і видами раку.

У одному варіанті здійснення способів діагностування, виявлення і моніторингу пухлинної хвороби біологічний зразок є зразком тканини або органу, в якому клітини, у тому випадку, коли в тканині або органі відсутня пухлина, практично не експресують CLDN6 і не характеризуються значним зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Бажано вказана тканина є тканиною, відмінною від тканини плаценти.

Як правило, рівень молекули-мішені в біологічному зразку порівнюється з еталонним рівнем, причому відхилення від вказаного еталонного рівня указує на наявність і/або стадію пухлинного захворювання у суб'єкта. Еталонний рівень може бути таким же, як рівень, визначений в контрольному зразку (наприклад, зразку здорової тканини або від здорового суб'єкта), або середнім рівнем у здорових суб'єктів. "Відхилення" від вказаного еталонного рівня означає будь-яку значущу зміну, наприклад, збільшення або зменшення, щонайменше, на 10 %, 20 %, або 30 %, бажано, щонайменше, на 40 % або 50 %, або навіть більше. Збільшена наявність CLDN6 або клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, у вказаному біологічному зразку або збільшена кількість CLDN6 або клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, в біологічному зразку в порівнянні з еталонним рівнем указує на наявність пухлинного захворювання.

В більшості випадків виявлення і/або визначення кількості в способах запропонованих винаходом включає використання мічених антитіл, які специфічно зв'язуються з молекулою-мішенню.

У окремому аспекті винахід має відношення до способу виявлення, тобто визначення положення або місця розташування пухлини, наприклад, в конкретній тканині або органі, який передбачає введення антитіла запропонованого даним винаходом, яке з'єднується з

детектованою міткою у пацієнта. Мічення тканини або органу у вказаного пацієнта може вказувати присутність пухлини або наявність ризику розвитку пухлинної хвороби у вказаній тканині або органі.

Наприклад, антитіла запропоновані винаходом можна безпосередньо отримати від гібридоми, яка експресує антитіло, або можна клонувати і рекомбінантно експресувати в клітині-господарі (наприклад, CHO клітині або лімфоцитарній клітині). Додатковими прикладами клітин-господарів є мікроорганізми, такі як *E. coli* і гриби, наприклад, дріжджі. Альтернативно, вони можуть проводитися рекомбінантно в трансгенних, таких, що не є людиною, тваринах і рослинах. Проте даний винахід також передбачає варіанти здійснення, в яких антитіла виробляються *in situ* шляхом імунізації або вакцинації пацієнта, як розкрито в описі.

Даний винахід також має відношення до нуклеїнових кислот, які містять гени або нуклеїновокислотні послідовності, які кодують антитіла або їх ділянки, наприклад, ланцюг антитіла, як описано тут. Нуклеїнові кислоти можуть входити до складу вектора, наприклад, плазмиди, косміди, вірусу, бактеріофага або іншого використаного вектора, наприклад, прийнятого в генній інженерії. Крім того, вектор може містити гени, наприклад, маркерні гени, які дають можливість відбирати вектор у відповідній клітині-господарі та за відповідних умов. Крім того, вектор може містити елементи контролю експресії, що забезпечують належну експресію закодованих ділянок у відповідних господарях. Такі елементи контролю відомі фахівцям і можуть включати промотор, касети сплайсингу і кодон ініціації трансляції.

Бажано нуклеїнова кислота винаходу функціонально прикріплюється до вищезазначеної послідовності, яка контролює експресію, забезпечуючи експресію в еукаріотичних і прокаріотичних клітинах. Елементи контролю, які забезпечують експресію в еукаріотичних і прокаріотичних клітинах, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки.

Способи конструювання нуклеїновокислотних молекул відповідно до даного винаходу з метою створення векторів, які містять вищезгадані нуклеїновокислотні молекули, введення векторів у відповідні обрані клітини-господарі, індукції (викликання) або досягнення експресії добре відомі в даній галузі техніки.

Додатковий аспект даного винаходу має відношення до клітини-господаря, яка містить нуклеїнову кислоту або вектор, розкриті тут.

Інші ознаки і переваги даного винаходу стануть зрозумілими з наступного докладного опису і пунктів формули винаходу.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Вирівнювання послідовностей CLDN3, CLDN4, CLDN6 і CLDN9.

Фіг. 2. Імунофлуоресцентний аналіз сироватки, отриманої від мишей, імунізованих з метою отримання CLDN6-специфічних антитіл.

(А) Неприкріплені клітини CHO-K1, котрансфіковані нуклеїновими кислотами, які кодують людський CLDN6 і GFP, відповідно, були досліджені за допомогою анти-CLDN6 моноклональних мишачих антитіл (R&D Systems, MAB3656). CLDN6 розташовується на плазматичній мембрані трансфікованих клітин і може бути ціллю для специфічних антитіл на живих клітинах.

(В) Сироватка мишей, на основі якої була отримана гібридома F3-6C3-H8, містила антитіла, які зв'язуються з CLDN6 на поверхні неприкріплених клітин CHO-K1, котрансфікованих нуклеїновими кислотами, які кодують людський CLDN6 і GFP.

Фіг. 3. Аналіз ендогенної експресії білків-клаудинів в клітинах HEK293T методом Вестерн-блотінгу.

Білкові лізати HEK293T-клітин, трансфікованих нуклеїновими кислотами, які кодують CLDN3, CLDN4, CLDN6 і CLDN9, відповідно, або фіктивно трансфіковані (контроль) були досліджені за допомогою Вестерн-блотінгу з використанням комерційно доступних анти-CLDN3(A) (Invitrogen, Cat No. 34-1700), анти-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), анти-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) і анти-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672) антитіл. Антитіла виявляли експресію своїх відповідних мішеней тільки у відповідних HEK293T трансфектантах. У нетрансфікованих HEK293T клітинах не спостерігалось ендогенної експресії яких-небудь з цих клаудинів.

Фіг. 4. Оцінка специфічності комерційно доступних анти-CLDN-антитіл за допомогою проточної цитометрії.

Зв'язування комерційно доступних анти-CLDN-антитіл з клітинами HEK293T, трансфікованими нуклеїновими кислотами, які кодують CLDN3, CLDN4, CLDN6 і CLDN9, відповідно, або нетрансфікованими клітинами визначали за допомогою проточної цитометрії. Для цієї мішені специфічним є тільки комерційно доступне анти-CLDN3-антитіло.

Фіг. 5. Оцінка специфічності анти-CLDN-антитіл, отриманих згідно винаходу, за допомогою проточної цитометрії.

За допомогою проточної цитометрії було визначено зв'язування антитіл в супернатантах від

моноклональних субклонів гібридами з HEK293T клітинами, котрансфікованими вектором, який кодує CLDN6, CLDN3, CLDN4 5 або CLDN9, і вектором, який кодує флуоресцентний маркер.

(A) Антитіла в супернатанті від моноклонального субклову гібридами F3-6C3-H8 специфічно зв'язувалися з CLDN6-трансфікованими клітинами, але не з клітинами, трансфікованими CLDN3, CLDN4 і CLDN9, відповідно. Навпаки, антитіла в супернатанті від моноклонального субклову гібридами F4-4F7-F2 зв'язувалися з клітинами, трансфікованими CLDN6 або CLDN9. Антитіла в супернатанті від моноклонального субклову гібридами F3-6C3-H8 також зв'язувалися з клітинами, трансфікованими (I143V) -SNP варіантом CLDN6.

(B) Антитіла в супернатанті від моноклонального субклову гібридами F3-7B3-B4 зв'язувалися з клітинами, трансфікованими CLDN6, CLDN3 або CLDN9. Антитіла в супернатанті від моноклонального субклову гібридами F3-3F7-A5 зв'язувалися з клітинами, трансфікованими CLDN6, CLDN4 або CLDN9.

Фіг. 6. Специфічність зв'язування анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A.

Зв'язування анти-CLDN6-антитіл з людськими CLDN6, 3, 4, 9 і CLDN6 SNP (одиначний нуклеотидний поліморфізм) варіантом 1143V було проаналізовано проточною цитометрією за допомогою HEK293T клітин, які короточасно експресують відповідний людський клаудин. HEK293T були котрансфіковані флуоресцентним маркером, щоб розрізнити нетрансфіковані (Q1 і Q3 популяція) і трансфіковані (Q2 і Q4 популяція) клітини. Використовували концентрацію антитіл, яка насичала зв'язування з CLDN6 (25 мкг/мл). Експресію людських CLDN6, 3, 4, 9 і CLDN6-SNP(H43V) підтверджували за допомогою комерційно доступних моноклональних антитіл до людського клаудину-6 (R&D Systems, MAB3656), людського клаудину-3 (R&D Systems, MAB4620) і людського клаудину-4 (R&D Systems, MAB 4219).

Фіг. 7. Відносна спорідненість анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A.

Для визначення відносної спорідненості за допомогою проточної цитометрії досліджували зв'язування анти-CLDN6-антитіл з людським CLDN6, стабільно експресованим на поверхні HEK293-клітин. У експерименті із насичення зв'язування концентрацію антитіл наносили на графік проти FACS-сигналів (середня інтенсивність флуоресценції). EC₅₀ (концентрація антитіла, яка зв'язується з половиною місць зв'язування у стані рівноваги) обчислювали за допомогою нелінійної регресії. CLDN6-специфічні антитіла muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A показали дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 200-500 нг/мл), причому насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій.

Фіг. 8. Активність, пов'язана з комплементзалежною цитотоксичністю (CDC), анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A.

CDC-активність анти-CLDN6 антитіл проаналізували, використовуючи люцифераза-залежний метод аналізу для визначення ендогенної АТФ в нелізованих клітинах. Для цього CHO-K1 клітини, які стабільно експресують людський CLDN6, обробили різними концентраціями muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A. MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A продемонстрували дозозалежну CDC-активність і викликали CDC за низьких концентрацій.

Фіг. 9. Активність, пов'язана з комплементзалежною цитотоксичністю (CDC), анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл muMAB 65A і 66B на клітині NEC8 і NEC8 LVTS2 54 (CLDN6 нокаутні), які ендогенно експресують CLDN6.

Анти-CLDN6-антитіла muMAB 65A і 66B викликали CDC на клітинах NEC8 дозозалежним чином. Мішень-специфічність muMAB 65A і 66B забезпечувалася використанням NEC8 LVTS2 54 клітин (CLDN6 нокаутні).

Фіг. 10. Терапевтичний ефект раннього лікування антитілами muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A на моделі ксенотрансплантату мишей з прищепленою лінією пухлинних клітин NEC8.

Використовували модель ксенографтів NEC8, які ендогенно експресують CLDN6, на безтімусних Nude-Foxn1^{nu} мишах. В порівнянні з контрольною групою (фізіологічний розчин) muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65 A, 66B і 67A показали інгібування росту пухлини у мишей з прищепленими клітинами NEC8.

Фіг. 11. Специфічність зв'язування анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 6III, 64A, 67A і 89A.

Зв'язування анти-CLDN6-антитіл з людським CLDN6, 3, 4 і 9, відповідно, проаналізували за допомогою проточної цитометрії, використовуючи клітини HEK293, які стабільно експресують відповідний людський клаудин. Використаною концентрацією антитіл була концентрація, яка насичує зв'язування (25 мкг/мл). Експресію людських CLDN3, 4, 6 і 9 підтверджували за допомогою комерційно доступних моноклональних антитіл до людського клаудину-3 (R&D

Systems, MAB4620) і людського клаудину-4 (R&D Systems, MAB 4219) і CLDN6/9-реактивних мишачих моноклональних антитіл muMAB 5F2D2, відповідно. Негативний контроль здійснювався за ідентичних умов без первинного антитіла.

Фіг. 12. Відносна спорідненість анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 61D, 64A, 67A і 89A до клітин HEK293-CLDN6.

Для визначення відносної спорідненості зв'язування анти-CLDN6 антитіл з людським CLDN6, стабільно експресованим на поверхні HEK293, клітини досліджували за допомогою проточної цитометрії. У експериментах із насичення зв'язування концентрацію антитіл наносили проти FACS-сигналів (середня інтенсивність флуоресценції). EC₅₀ (концентрація антитіл, яка зв'язує половину місць зв'язування в рівновазі) обчислювали шляхом нелінійної регресії. CLDN6-специфічні антитіла chimAB 64A і 89A показали дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 450-600 нг/мл), при цьому насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій. ChimAB 67A і 61D показали низькі (EC₅₀ 1000 нг/мл) і середні (EC₅₀ 2300 нг/мл) значення EC₅₀, відповідно.

Фіг. 13. Відносна спорідненість анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 61D, 64A, 61A і 89A до клітин NEC8.

Для визначення відносної спорідненості анти-CLDN6 антитіл до пухлинних клітин, які ендогенно експресували CLDN6, зв'язування з лінією клітин раку яєчка NEC8 досліджували за допомогою проточної цитометрії. Антитіла chimAB 64A і 89A показали дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 600-650 нг/мл), причому насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій, тоді як chimAB 61D і 67A показали середні (EC₅₀ 1700 нг/мл) і високі (EC₅₀ 6100 нг/мл) значення EC₅₀, відповідно.

Фіг. 14. Відносна спорідненість анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 61D, 64A, 67A і 89A до клітин OV90.

Для визначення афінності зв'язування анти-CLDN6-антитіл з пухлинними клітинами, які ендогенно експресують людський CLDN6, досліджували зв'язування з лінією клітин карциноми яєчника OV90 за допомогою проточної цитометрії. CLDN6-специфічні антитіла chimAB 64A і 89A показали дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 550-600 нг/мл) і насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій. CHIMAB 61D і 67A показали середні значення EC₅₀ (EC₅₀ 1500 нг/мл і EC₅₀ 2300 нг/мл, відповідно).

Фіг. 15. Активність, пов'язана з комплементзалежною цитотоксичністю (CDC), анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 61D, 64A, 67A і 89A на клітинах дикого типу NEC8 і нокаутних клітинах NEC8.

CDC-активність анти-CLDN6-антитіл проаналізували за допомогою люцифераза-залежного методу аналізу для визначення ендогенної АТФ в нелізованих клітинах. Для цього клітини дикого типу NEC8 (NEC8 LVTS2 77), які ектопічно експресують люциферазу, обробили різними концентраціями chimAB 61D, 64A, 67A і 89A. На клітинах NEC-8 chimAB 61D, 64A, 67A і 89A показали дозозалежну CDC-активність, тоді як жодні з цих антитіл не викликали неспецифічний лізис CLDN6-нокаутних клітин NEC-8 (NEC8 LVTS2 54). Цей результат продемонстрував мішень-специфічні ефекторні функції chimAB 61D, 64A, 67A і 89A.

Фіг. 16. Активність, пов'язана з антитілозалежною клітинною цитотоксичністю (ADCC), анти-CLDN6 химерних моноклональних антитіл chimAB 61D, 64A, 67A і 89A на клітинах дикого типу NEC8 і нокаутних клітинах NEC8.

ADCC-активність анти-CLDN6 антитіл проаналізували за допомогою люцифераза-залежного методу аналізу для визначення ендогенної АТФ в нелізованих клітинах. Для цього клітини NEC-8 дикого типу (NEC8 LVTS2 77) обробили різними концентраціями chimAB 61D, 64A, 67A і 89A. CHIMAB 61D, 64A, 67A і 89A показали дозозалежну ADCC-активність, і викликали ADCC навіть за низьких концентрацій антитіл. Щоб продемонструвати мішень-специфічність використовували клітини NEC8 із стабільно нокаутним CLDN6 (NEC8 LVTS2 54).

Фіг. 17. Довгостроковий терапевтичний ефект раннього лікування анти-CLDN6 мишачими моноклональними антитілами muMAB 61D, 64A і 67A на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

Використовували модель ксенотрансплантатів NEC8, які ендогенно експресують CLDN6, на безтімусних Nude-Foxn1^{nu} мишах. Протягом 46 днів мишей лікували CLDN6-специфічними антитілами. Після лікування контролювали зростання пухлини протягом 60 днів. Навіть після припинення імунотерапії у мишей, яких лікували мишачими моноклональними антитілами muMAB 61D, 64A і 67A, не спостерігалось зростання пухлини.

Фіг. 18. Терапевтичний ефект раннього лікування анти-CLDN6 мишачими моноклональними антитілами muMAB 89A на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

Використовували модель ксенотрансплантатів NEC8, які ендогенно експресують CLDN6, на

безтімусних Nude-Foxn1^{nu} мишах. Діаграми розсіювання представляють об'єми прищеплених пухлин в різні моменти часу протягом раннього лікування NEC8 ксенотрансплантатів у безтімусних мишей Nude-Foxn1^{nu}. У порівнянні з контрольною групою (фізіологічний розчин) туМАВ 89А показали інгібування росту пухлини у мишей з прищепленими клітинами NEC8 (А).
 5 Протягом 47 днів мишей обробляли PBS (контрольну групу) і CLDN6-специфічними антитілами, відповідно. Зростання пухлин контролювали протягом 51 дня. В порівнянні з PBS-контролем у мишей, яких лікували туМАВ89А, в кінці дослідження (В) пухлині не були виявлені.

Фіг. 19. Терапевтичний ефект анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл туМАВ 64А на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

10 Діаграми розсіювання представляють об'єми прищеплених пухлин в різні моменти часу під час лікування розвинених ксенотрансплантатів NEC8 у безтімусних мишей Nude-Foxn1^{nu}. Імунотерапія мишачими моноклональними анти-CLDN6 антитілами туМАВ 64А продемонструвала інгібування росту солідних NEC8-ксенотрансплантатів у порівнянні з контрольними групами і з антитілом і з фізіологічним розчином.

15 Фіг. 20. Довгостроковий терапевтичний ефект лікування анти-CLDN6 мишачими моноклональними антитілами туМАВ 64А на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

Через 15 днів після приживання трансплантата протягом 45 днів мишей лікували CLDN6-специфічним антитілом туМАВ 64А. Зростання пухлин контролювали протягом додаткових 49 днів (А). На графіку видно збільшення тривалості життя мишей, яких лікували CLDN6-специфічним антитілом туМАВ 64А (В).

Фіг. 21. Терапевтичний ефект анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл туМАВ 61D, 67А і 89А на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

25 Діаграми розсіювання представляють об'єми прищеплених пухлин NEC8 в різні моменти часу під час лікування розвинених ксенотрансплантатів NEC8. За допомогою мишачих моноклональних анти-CLDN6 антитіл туМАВ 61D, 67А і 89А було досягнуто інгібування росту пухлин у порівнянні з контрольними групами (фізіологічний розчин і антитіло).

30 Фіг. 22. Довгостроковий терапевтичний ефект анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл туМАВ 61D, 67А і 89А на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин NEC8.

Через 17 днів після приживання трансплантата протягом 42 днів мишей лікували CLDN6-специфічними антитілами туМАВ 61D, 67А і 89А. Зростання пухлини контролювали протягом додаткових 49 днів (А). На графіку видно збільшення тривалості життя мишей, яких лікували CLDN6-специфічними антитілами туМАВ 61D і 67А (В).

35 Фіг. 23. Терапевтичний ефект анти-CLDN6 мишачих моноклональних антитіл туМАВ 64А і 89А на моделі ксенотрансплантату у мишей з прищепленою пухлинною лінією клітин дикого типу NEC8 і NEC8-клітинами із стабільно нокаутним CLDN6.

40 туМАВ 64А і 89А показали терапевтичну дію тільки у мишей з прищепленою пухлиною дикого типу NEC8, але не у мишей з прищепленими клітинами NEC8 з нокаутним CLDN6, що показує специфічність антитіл до мішені *in vivo*.

Фіг. 24. Картування епітопів chimAB 61D, 64А, 67А і 89А з високим розрізненням.

Аланінові мутанти називаються "залишок дикого типу число аланін" або "залишок дикого типу число гліцин" у випадку аланіну дикого типу, де амінокислоти даються у вигляді
 45 однобуквенного коду. Амінокислоти F35, G37, S39 і можливо T33 першого позаклітинного домену CLDN6 важливі для взаємодії з CLDN6-специфічними химерними антитілами chimAB 61D, 64А, 67А і 89А. Залишок 140 необхідний для зв'язування chimAB 89А, причому він сприяє скріпленню chimAB 61D і 67А. Крім того, L151 другого позаклітинного домену CLDN6 сприяє взаємодії з chimAB 67А. Хоча експерименти із застосуванням імунофлуоресценції підтвердили експресію CLDN6 у мутантів P28А, W30А, G49А, L50А, W51А, C54А і C64А, вони не показали фарбування мембран. З цієї причини ми не могли виключити взаємодію наших антитіл з цими амінокислотами. Загалом, як встановлено тут, епітоп відповідає нашій стратегії імунізації за допомогою ДНК і пептидів ECI-домену CLDN6.

55 Фіг. 25. Вирівнювання варіабельної області важкого ланцюга амінокислотних послідовностей CLDN6-специфічних антитіл запропонованих даним винаходом.

CDR-послідовності (HCDR1, HCDR2 і HCDR3) виділені прямокутником.

Фіг. 26. Вирівнювання варіабельної області легкого ланцюга амінокислотних послідовностей CLDN6-специфічних антитіл запропонованих даним винаходом.

CDR-послідовності (LCDR1, LCDR2 і LCDR3) виділені прямокутником.

60 Визначення термінів

Для того, щоб даний винахід був зрозумілішим, спочатку даються визначення термінів. Додаткові визначення висловлюються протягом всього докладного опису.

На протягом всього докладного опису і подальших пунктів формули винаходу, якщо контекст не вимагає іншого, слід розуміти, що слово "містить" і його варіанти, такі як "утримує" і "який містить", припускає включення певного члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій, а не виключення будь-якого іншого члена, цілого числа або стадії або групи членів, цілих чисел або стадій. Терміни в однині, використані в контексті опису винаходу (особливо в контексті формули винаходу) слід тлумачити як такі, що включають і однину і множину, якщо в описі не вказано інакшого або інше явно не продиктоване контекстом. Перераховування меж значень в описі служить тільки як спосіб скорочення згадування окремо кожного окремого значення, яке потрапляє в межі. Якщо не вказане іншого, кожне окреме значення включається в докладний опис, неначе воно було окремо перераховане в описі. Всі описані тут методи можуть здійснюватися в будь-якому відповідному порядку, якщо в описі не вказано інакше або інше явним чином не протирічить контексту. Використання всіх без виключення прикладів або характерних виразів (наприклад, "такий як"), наданих в описі, має на меті тільки краще ілюструвати винахід і не обмежує рамки винаходу, заявлені в іншій формі. Формулювання докладного опису не повинно тлумачитись, як такі, що означають який-небудь незаявлений елемент, істотний для здійснення винаходу на практиці.

Клаудини є білками, які є найбільш важливими компонентами щільних контактів, де вони створюють трансклітинний бар'єр, який контролює потік молекул в міжклітинному просторі між клітинами епітелію. Клаудини є трансмембранними білками, які перетинають мембрану 4 рази, при цьому і N-кінець і C-кінець розташовуються в цитоплазмі. Перша позаклітинна петля складається в середньому з 53 амінокислот і друга петля із близько 24 амінокислот. CLDN6 і CLDN9 є найбільш схожими членами родини CLDN.

Термін "CLDN", як він використовується в описі, означає клаудин і включає CLDN6, CLDN9, CLDN4 і CLDN3. Переважно CLDN є людським CLDN.

Термін "CLDN6" бажано має відношення до людського CLDN6 і зокрема до (i) нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, наприклад, до нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїновокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, або (ii) білка, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8. Перша позаклітинна петля CLDN6 бажано містить амінокислоти з 28 до 80, краще амінокислоти з 28 до 76 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 2, або амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 8, наприклад, амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 7. Друга позаклітинна петля CLDN6 бажано містить амінокислоти з 138 до 160, бажано амінокислоти з 141 до 159, краще амінокислоти з 145 до 157 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 2, або амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 8, такої як амінокислотна послідовність, вказана в SEQ ID NO: 6. Вказані перша і друга позаклітинні петлі бажано утворюють позаклітинну ділянку CLDN6.

Термін "CLDN9" бажано має відношення до людського CLDN9 і, зокрема, до (i) нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, або (ii) білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9. Перша позаклітинна петля CLDN9 бажано містить амінокислоти з 28 до 76 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 9. Друга позаклітинна петля CLDN9 бажано містить амінокислоти з 141 до 159 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 9. Вказані перша і друга позаклітинні петлі бажано утворюють позаклітинну ділянку CLDN9.

Термін "CLDN4" бажано має відношення до людського CLDN4 і зокрема до (i) нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, або (ii) білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10. Перша позаклітинна петля CLDN4 бажано містить амінокислоти з 28 до 76 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 10. Друга позаклітинна петля CLDN4 бажано містить амінокислоти з 141 до 159 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 10. Вказані перша і друга позаклітинні петлі бажано утворюють позаклітинну ділянку CLDN4.

Термін "CLDN3" бажано має відношення до людського CLDN3 і, зокрема, до (i) нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, або (ii) білок, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11. Перша позаклітинна петля CLDN3 бажано містить амінокислоти з 27 до 75 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: 11. Друга позаклітинна петля CLDN4 бажано містить амінокислоти з 140 до 158 амінокислотної послідовності, вказаної в SEQ ID NO: П. Вказані перша і друга позаклітинні петлі бажано утворюють позаклітинну ділянку CLDN3.

Описані вище послідовності CLDN включають будь-які варіанти вказаних послідовностей, зокрема мутанти, сплайс-варіанти, конформації, ізоформи, алельні варіанти, видові варіанти і видові гомологи, зокрема наявні в природі. Алельний варіант має відношення до зміни в нормальній послідовності гена, значення якого часто є незрозумілим. Повне генетичне секвенування часто визначає численні алельні варіанти для даного гена. Видовий гомолог є нуклеїновокислотою або амінокислотою послідовністю, джерелом походження яких є інший вид ніж у даної нуклеїновокислотної або амінокислотної послідовності. Термін "CLDN" включає (i) CLDN сплайс-варіанти, (ii) CLDN-посттрансляційно модифіковані варіанти, зокрема включаючи варіанти з різним глікозилюванням, наприклад статусом N-глікозилювання, (iii) CLDN конформаційні варіанти, (iv) варіанти CLDN, пов'язаного з раком, і CLDN не пов'язаного з раком. Бажано CLDN перебуває в його нативній конформації.

Було виявлено, що CLDN6 експресується при раку, наприклад, раку яєчника, раку легень, раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, меланомі, раку голови і шиї, саркоми, раку жовчних шляхів, нирковоклітинному раку і раку сечового міхура. Зокрема, CLDN6 є бажаною мішенню для запобігання і/або лікування раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника і тератоканциноми яєчника, раку легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинного раку легень і аденокарциноми, раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми і плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, раку голови і шиї, зокрема злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, зокрема синовіальної саркоми і карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми і папілярного раку, раку нирки, зокрема нирковоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка і ембріонального раку яєчка, раку матки, герміноми, такої як, тератоканцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм. У одному варіанті здійснення ракове захворювання, пов'язане з експресією CLDN6, вибирають з групи, яка складається з раку яєчника, раку легень, метастатичного раку яєчника і метастатичного раку легень. Переважно рак яєчника є карциномою або аденокарциномою. Переважно рак легень є карциномою або аденокарциномою, і переважно є бронхіолярним раком, наприклад, бронхіолярною карциномою або бронхіолярною аденокарциномою. У одному варіанті здійснення пухлинна клітина, пов'язана з експресією CLDN6, є клітиною такого раку.

Термін "частина" відноситься до ділянки. Відносно окремої структури, наприклад, амінокислотної послідовності або білка, термін "частина" може позначати неперервну або перервану ділянку вказаної структури. Бажано частина амінокислотної послідовності містить, щонайменше, 1 %, щонайменше 5 %, щонайменше 10 %, щонайменше 20 %, щонайменше 30 %, бажано, щонайменше, 40 %, бажано, щонайменше, 50 %, краще, щонайменше, 60 %, краще, щонайменше, 70 %, ще краще, щонайменше, 80 % і найкраще, щонайменше, 90 % амінокислот вказаної амінокислотної послідовності. Бажано, якщо частина є перерваною ділянкою, вказана перервана ділянка складається з 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше частин структури, причому кожна частина є неперервним елементом структури. Наприклад, перервана ділянка амінокислотної послідовності може складатися з 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше, бажано не більше ніж 4 частин вказаної амінокислотної послідовності, при цьому кожна частина бажано містить, щонайменше, 5 неперервних амінокислот, щонайменше, 10 неперервних амінокислот, бажано, щонайменше, 20 неперервних амінокислот, бажано, щонайменше, 30 неперервних амінокислот амінокислотної послідовності.

Терміни "частина" і "фрагмент" використовуються тут як взаємозамінні та відносяться до неперервного елементу. Наприклад, частина структури, така як амінокислота послідовність або білок відноситься до неперервного елементу вказаної структури. Ділянка, частина або фрагмент структури бажано включає в собі одне або більше функціональних властивостей вказаної структури. Наприклад, ділянка, частина або фрагмент епітопу або пептиду бажано є імунологічно еквівалентним (рівнозначним) до епітопу або пептиду, з якого він отриманий.

Термін "позаклітинна ділянка CLDN" в контексті даного винаходу відноситься до частини CLDN, оберненої до позаклітинного простору клітини і доступної із зовнішньої частини вказаної клітини, що є бажаним, наприклад, для антитіл, розташованих зовні клітини. Бажано термін відноситься до однієї або більше позаклітинних петель або їх частини або будь-якої іншої позаклітинної частини CLDN, яка бажано є специфічною для вказаного CLDN. Бажано вказана

частина містить, щонайменше 5, щонайменше 8, щонайменше 10, щонайменше 15, щонайменше 20, щонайменше 30, або щонайменше 50 амінокислот або більше.

Необхідно розуміти, що термін "CLDN, зв'язаний з поверхнею клітини" відноситься до нативного CLDN, тобто CLDN в його неденатурованому, бажано природно згорнутому стані. Бажано термін "CLDN, зв'язаний з поверхнею клітини" означає, що CLDN зв'язується з, і розташовується на плазматичній мембрані вказаної клітини, при цьому, щонайменше, частина CLDN, бажано позаклітинна ділянка, обернена до позаклітинного простору вказаної клітини і є доступною із зовнішньої частини вказаної клітини, наприклад, для антитіл, розташованих зовні клітини. Зв'язок може бути прямим або непрямим (опосередкованим). Наприклад, зв'язок може здійснюватися одним або більше трансмембранними доменами, одним або більше ліпідними якорями і/або шляхом взаємодії з будь-яким іншим білком, ліпідом, сахаридом або іншою структурою, яка знаходиться на зовнішній стороні плазматичної мембрани клітини. Наприклад, CLDN, зв'язаний з поверхнею клітини, може бути трансмембранним білком, тобто інтегральним мембранним білком, який має позаклітинну ділянку, або може бути білком, зв'язаним з поверхнею клітини, за допомогою взаємодії з іншим білком, який є трансмембранним білком.

CLDN6 є з'єднаним з поверхнею клітини, якщо він розташовується на поверхні вказаної клітини і є доступним для зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітини. У кращих варіантах здійснення клітина, яка характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, є клітиною, яка експресує CLDN6. Слід розуміти, що у випадку, коли клітини експресують CLDN6, сполучений з поверхнею вказаних клітин, CLDN6 може бути тільки частиною експресованого CLDN6.

Термін "клітина, яка несе CLDN", переважно означає, що вказана клітина несе CLDN на своїй поверхні, тобто що CLDN з'єднується з поверхнею вказаної клітини.

Термін "клітинна поверхня" або "поверхня клітини" використовується відповідно до його звичайного значення в даній області і відповідно включає зовнішню поверхню клітини, доступну для зв'язування з білками і іншими молекулами.

Вираз "CLDN, експресований на поверхні клітини" означає, що CLDN, експресований клітиною, входить до складу поверхні вказаної клітини.

Відповідно до винаходу CLDN6 є частково експресованим в клітині і є частково сполученим з клітинною поверхнею, якщо рівень експресії і з'єднання є нижчим у порівнянні з експресією і з'єднанням в клітинах плаценти або в тканині плаценти. Бажано рівень експресії і з'єднання є менше ніж на 10 %, бажано менше ніж на 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % або 0,05 % від експресії і з'єднання в клітинах плаценти або в тканині плаценти або навіть нижче. Бажано, CLDN6 є частково експресованим в клітині і є частково сполученим з клітинною поверхнею, якщо рівень експресії і з'єднання перевищує рівень експресії і з'єднання в неканцерогенній, доброякісній тканині, відмінній від тканини плаценти, не більше ніж в 2-рази, бажано 1,5-рази і бажано не перевищує рівень експресії і з'єднання у вказаній неканцерогенній, доброякісній тканині. Бажано CLDN6 є частково експресованим в клітині і є частково сполученим з клітинною поверхнею, якщо рівень експресії і з'єднання є рівнем нижчим від межі виявлення і/або якщо рівень експресії і з'єднання є дуже низьким для здійснення зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітин.

Відповідно до винаходу CLDN6 експресується в клітині і з'єднується з клітинною поверхнею, якщо рівень експресії і з'єднання перевищує рівень експресії і з'єднання в неканцерогенній іншій доброякісній тканині, відмінній від тканини плаценти, бажано більше ніж в 2-рази, бажано в 10-разів, 100-разів, 1000-разів або 10000-разів. Бажано CLDN6 експресується в клітині і з'єднується з клітинною поверхнею, якщо рівень експресії і з'єднання є вищим від межі виявлення і/або якщо рівень експресії і з'єднання є достатньо високим для здійснення зв'язування CLDN6-специфічними антитілами, доданими до клітин. Бажано CLDN6, експресований в клітині, експресується або експонується на поверхні вказаної клітини.

Термін "плот" відноситься до мікродоменів мембрани, багатим на сфінголіпіди і холестерин, розташованим в просторі зовнішнього "листка" (шару) плазматичної мембрани клітини. Здатність деяких білків з'єднуватися усередині таких доменів та їх здатність утворювати "агрегати" або "фокальні агрегати" може впливати на функцію білків. Наприклад, переміщення молекул CLDN6 в такі структури після зв'язування антитілами даного винаходу, створює високу щільність комплексів CLDN6-антиген-антитіло в плазматичних мембранах. Така висока щільність комплексів CLDN6-антиген-антитіло може дати поштовх ефективній активації системи комплементу під час CDC.

Відповідно до винаходу термін "хвороба" відноситься до будь-якого патологічного стану, включаючи рак, зокрема, описані тут форми раку.

"Хвороби, які торкаються клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням

CLDN6 з клітинною поверхнею" означає згідно винаходу, що експресія і з'єднання в клітинах ураженої тканини або органу переважно є збільшеними в порівнянні з показниками для здорової тканини або органу. Під збільшенням розуміють збільшення, щонайменше, на 10 %, зокрема, щонайменше, 20 %, щонайменше 50 %, щонайменше 100 %, щонайменше 200 %, щонайменше 500 %, щонайменше 1000 %, щонайменше 10000 % або навіть більше. У одному варіанті здійснення експресія і з'єднання з клітинною поверхнею виявляється тільки в ураженій тканині, тоді як експресія в здоровій тканині пригнічується. Відповідно до винаходу, хвороби, пов'язані з клітинами, які експресують CLDN6 і які характеризуються з'єднанням CLDN6 з їх клітинною поверхнею, включають пухлинні захворювання, такі як ракові захворювання. Більше того, відповідно до винаходу, пухлинні захворювання, такі як ракові захворювання переважно є тими хворобами, при яких клітини пухлини або ракові клітини експресують CLDN6 і характеризуються з'єднанням CLDN6 з їх клітинною поверхнею.

Терміни "пухлинна хвороба", "хвороба, пов'язана з пухлиною" або "онкогенна хвороба", як вони використовуються в описі, включають хворобу, яка відрізняється неправильно регульованим клітинним ростом, проліферацією, диференціюванням, адгезією і/або міграцією, що може приводити до утворення або схильності до утворення пухлини і/або пухлинних метастазів. Під "пухлинною клітиною" мають на увазі клітину, яка розмножується шляхом швидкого, неконтрольованого клітинного ділення і продовжує рости після припинення надходження стимулу, який ініціює нове зростання.

Під "пухлиною" мають на увазі аномальну групу клітин або тканину, яка росте в результаті швидкої неконтрольованої клітинної проліферації і продовжує рости після припинення надходження стимулу, який ініціює нове зростання. У пухлин спостерігається часткова або повна відсутність структурної організації і функціональної узгодженості з нормальною тканиною і зазвичай формується окрема маса тканини, яка може бути доброякісною, передзлаякісною або злаякісною.

Переважно "пухлинна хвороба", "хвороба, пов'язана з пухлиною" або "онкогенна хвороба" відповідно до винаходу є раком, тобто злаякісним захворюванням, а пухлинна клітина є раковою клітиною. Переважно "пухлинна хвороба", "хвороба, пов'язана з пухлиною" або "онкогенна хвороба" характеризується наявністю клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, причому пухлинна клітина експресує CLDN6 і характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею.

Клітина, яка експресує CLDN6 і яка характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, переважно є пухлинною клітиною або раковою клітиною, переважно клітиною пухлин і видів раку, описаних тут. Переважно така клітина є відмінною від клітин плаценти.

Переважно ракові хвороби або види раку відповідно до винаходу вибирають з групи, яка складається з раку яєчника, зокрема аденокарциноми яєчника і тератоканциноми яєчника, раку легень, включаючи дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC), зокрема плоскоклітинний рак легень і аденокарциному, раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, зокрема базальноклітинної карциноми і плоскоклітинної карциноми, злаякісної меланоми, раку голови і шиї, зокрема злаякісної плеоморфної аденоми, саркоми, зокрема синовіальної саркоми і карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, зокрема перехідно-клітинної карциноми і папілярного раку, раку нирки, зокрема нирковоклітинного раку, включаючи світлоклітинний рак нирки і папілярну карциному нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, включаючи рак клубової кишки, зокрема аденокарциному тонкої кишки і аденокарциному клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, зокрема семіноми яєчка, тератоми яєчка і ембріонального раку яєчка, раку матки, герміноми, такої як, тератоканцинома або ембріональна карцинома, зокрема ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм.

Основними видами раку легень є дрібноклітинний рак легень (SCLC) і недрібноклітинний рак легень (NSCLC). Існує три основні підтипи недрібноклітинного раку легень: плоскоклітинний рак легень, аденокарцинома і крупноклітинний рак легень. Аденокарциноми складають приблизно 10 % випадків раку легень. Зазвичай цей вид раку спостерігається на периферії легень, на противагу до дрібноклітинного раку легень і плоскоклітинного раку легень, які мають тенденцію розташовуватися більш центрально.

Рак шкіри є злаякісним утворенням на шкірі. Найпоширенішими видами раку шкіри є базальноклітинний рак, плоскоклітинна карцинома і меланома. Злаякісна меланома є тим типом раку шкіри, який викликає найбільше занепокоєння. Вона пов'язана з неконтрольованим ростом пігментних клітин - меланоцитів.

Відповідно до винаходу "карцинома" є раком, який починається у вистилаючому шарі

(епітеліальних клітинах) органів.

"Бронхіолярна карцинома" є карциномою легень і, як вважається, виникає в епітелії термінальних бронхіол, де неопластична тканина тягнеться по ходу альвеолярних стінок і росте в невеликих кількостях усередині альвеоли. Муцин може бути видно у деяких клітинах і в речовині в альвеолі, куди також включаються голі клітини.

"Аденокарцинома" є раком, який виникає в залозистій тканині. Ця тканина до того ж є частиною великої групи тканин, відомих як епітеліальні тканини. Епітеліальна тканина включає шкіру, залози і цілий ряд інших тканин, які вистилають порожнини і органи тіла. З погляду ембріології епітелій походить з ектодерми, ендодерми і мезодерми. Щоб відноситися до аденокарциноми, клітини необов'язково повинні бути частиною залози, якщо тільки вони проявляють секреторні властивості. Ця форма карциноми може виникати у деяких вищих тварин, включаючи людей. Добре диференційовані аденокарциноми мають тенденцію бути схожим на залозисту тканину, з якої вони походять, тоді як погано диференційовані не можуть. За допомогою фарбування клітин з матеріалу біопсії патолог визначає, чи є пухлина аденокарциномою або іншим типом раку. Аденокарциноми можуть виникати в багатьох тканинах організму унаслідок широкого поширення залоз в організмі. Разом з тим, що кожна залоза не може секретувати одну і ту ж речовину, коли у клітини існує зовнішньосекреторна функція, вона вважається залозистою, і тому її злоякісна форма називається аденокарциномою. Злоякісні аденокарциноми вторгаються в інші тканини і дають метастази, які також проникають в інші тканини. Аденокарцинома яєчника є найбільш поширеним типом карциноми яєчника. Сюди включаються серозні і слизисті аденокарциноми, світлоклітинна аденокарцинома і ендометриоїдна аденокарцинома.

"Цистаденокарцинома" є злоякісною формою поверхневої епітеліально-стромальної пухлини, типу карциноми яєчника.

Вважають, що поверхневі епітеліально-стромальні пухлини є класом новоутворень, які походять з поверхневого епітелію яєчника (зміненого peritoneum (очеревина)) або з ектопічного ендометрію або тканини фалопієвої (маткової) труби. Ця група пухлин складає більшість всіх пухлин яєчника.

Тератоканцинома відноситься до герміногенної пухлини, яка є сумішшю тератоми з ембріональною карциномою або з хоріокарциномою або з обома. Хоріокарцинома є злоякісною трофобластичною і таким раком, зазвичай плаценти, який швидко розвивається. Він характеризується раннім поширенням в легені з потоком крові.

Саркома є раком сполучної тканини (кісткової, хрящової, жирової), яка призводить до проліферації мезодерми. Цей вид раку протилежний до карцином, які мають епітеліальне походження. Синовіальна саркома є рідкісною формою раку, яка зазвичай зустрічається біля суглобів рук і ніг. Вона є одним з видів сарком м'яких тканин.

Нирково-клітинна карцинома, відома також як нирково-клітинний рак або нирково-клітинна аденокарцинома, є раком нирки, який походить з вистилання проксимальних звитих каналців, дуже маленьких трубочок в нирці, які фільтрують кров і видаляють продукти життєдіяльності. Нирково-клітинна карцинома є поза всяких сумнівів найбільш поширеним типом раку нирок у дорослих і найбільш летальним зі всіх уrogenітальних пухлин. Окремими підтипами нирково-клітинної карциноми є світлоклітинний рак нирок і папілярний рак нирок. Світлоклітинний рак нирок є найбільш поширеною формою нирково-клітинної карциноми. Під мікроскопом клітини світлоклітинного раку здаються дуже блідими або світлими. Папілярний рак нирок є другим найбільш поширеним підтипом. При деяких, якщо не при більшості, з цих форм раку утворюються невеликі пальцеподібні вирости (які називаються сосочками, папіломами).

Герміногенна пухлина є новоутворенням, яке походить з ембріональних клітин. Герміногенні пухлини можуть бути раковими і нераковими пухлинами. Зазвичай ембріональні клітини зустрічаються усередині гонад (яєчника і яєчка). Герміногенні пухлини, які виникають зовні гонад (наприклад, на голові, в роті, на шиї, нирковій мисці; у зародках, у немовлят і маленьких дітей найчастіше виявляються на середній лінії тіла, зокрема на кінчику куприка) можуть бути вродженими вадами розвитку, які виникають унаслідок помилок під час розвитку ембріона.

Двома основними класами герміногенних пухлин є семіноми і несеміноми, при цьому несеміноми включають тератоканциному, ембріональну карциному, пухлини жовткового мішка, хоріокарциному і диференційовану тератому. Більшість клітинних ліній від несеміном рівноцінні ембріональним карциномам, тобто вони майже повністю складаються із ствольових клітин, які не диференціюються за початкових умов, хоча деякі можуть реагувати на індукуючі чинники диференціювання, такі як ретиноева кислота.

Під "метастазуванням" мають на увазі поширення ракових клітин з первинного місцеположення в іншу частину організму. Утворення метастаз є дуже складним процесом і

залежить від відділення злоякісних клітин від первинної пухлини, інвазії позаклітинного матриксу, проникності ендотеліальних базальних мембран для проникнення в порожнину тіла і судин, а потім, після транспортування кровотоком, інфільтрації органів-мішеней. Нарешті, зростання нової пухлини в місці-мішені залежить від ангиогенезу. Метастази пухлини можуть

виникати навіть після видалення первинної пухлини, оскільки пухлинні клітини або компоненти можуть залишитися і розвинути метастатичний потенціал. У одному варіанті здійснення термін "метастази" відповідно до винаходу має відношення до "віддаленої метастази", тобто метастази, віддаленої від первинної пухлини і системи регіональних лімфатичних вузлів.

Клітини вторинної або метастатичної пухлини є такими ж, як в первинній пухлині. Це

означає, наприклад, що, якщо карцинома яєчника метастазує в печінку, вторинна пухлина складається з аномальних клітин яєчника, а не з аномальних клітин печінки. Пухлину в печінці потім називають метастатичною карциномою яєчника, а не раком печінки.

Під терміном "лікувати" розуміють введення суб'єктові сполуки або композиції, розкритих тут, для запобігання або усунення хвороби, включаючи зменшення розмірів пухлини або кількості пухлин у суб'єкта; затримки або уповільнення хвороби у суб'єкта; інгібування або уповільнення розвитку нової хвороби у суб'єкта; зменшення частоти і тяжкості симптомів і/або рецидивів у суб'єкта, який має в даний час або що раніше мав захворювання; і/або подовження, тобто збільшення тривалості життя суб'єкта.

Термін "лікування хвороби" передбачає зцілення, скорочення тривалості, поліпшення, запобігання, уповільнення або придушення прогресу або погіршення або запобігання або затримку початку хвороби або її симптомів.

Під тим, "який має ризик" мають на увазі суб'єкт, тобто пацієнт, який має вищий, ніж зазвичай, шанс розвитку хвороби, зокрема раку, в порівнянні з основною популяцією. Крім того, суб'єкт, який мав або в даний час має хворобу, зокрема рак, є суб'єктом з підвищеним ризиком розвитку хвороби, оскільки хвороба у суб'єкта може продовжувати розвиватися. У суб'єктів, які мають рак в даний час або що мали рак, також є підвищений ризик утворення метастазів раку.

Термін "імунотерапія" має відношення до лікування, яке зачіпає специфічну імунну реакцію. У контексті даного винаходу такі терміни як "оберегти (захистити)", "запобігти", "профілактичний", "превентивний" або "запобіжний" мають відношення до запобігання або лікування і виникнення і/або поширення пухлини у індивідуума. Термін "імунотерапія" в контексті даного винаходу бажано відноситься до активної пухлинної імунізації або протипухлинної вакцинації. Профілактичне введення імунотерапії, наприклад профілактичне введення композиції винаходу, бажано оберігає реципієнта від розвитку пухлинного зростання. Терапевтичне проведення імунотерапії, наприклад терапевтичне введення композиції винаходу, може привести до придушення прогресування/зростання пухлини. Сюди включається зменшення швидкості прогресування/зростання пухлини, зокрема переривання прогресування пухлини, яке бажано веде до усунення пухлини. Терапевтичне проведення імунотерапії може захистити індивідуума, наприклад, від поширення або метастазування існуючих пухлин.

Термін "імунізація" або "вакцинація" описує процес введення антигену суб'єктові з метою викликати імунну відповідь через терапевтичні або профілактичні причини.

Терміни "суб'єкт", "індивідуум", "організм" або "пацієнт" використовуються як взаємозамінні і мають відношення до хребетних, бажано ссавців. Наприклад, ссавці в контексті даного винаходу є людьми, приматами, тваринами, які не є людьми, домашніми тваринами, такими як собаки, кішки, вівці, велика рогата худоба, кози, свині, коні тощо, лабораторними тваринами, такими як миші, щури, кролики, морські свинки тощо, а також тваринами, яких утримують, наприклад, в зоопарку. Термін "тварина" як він використовується в описі також включає людей. Термін "суб'єкт" також може включати пацієнта, тобто тварину, краще людину, яка має хворобу, переважно хворобу, пов'язану з експресією CLDN6, переважно онкогенну хворобу, таку як рак.

Термін "ад'ювант" відноситься до сполук, які подовжують або підсилюють або прискорюють імунну відповідь. Композиція даного винаходу бажано впливає без додавання ад'ювантів. Проте, композиція даної заявки може містити будь-який відомий ад'ювант. Ад'юванти включають різномірну групу сполук, таких як олійні емульсії (наприклад, ад'юванти Фрейнда), мінеральні сполуки (такі як галун), бактерійні продукти (такі як токсин *Bordetella pertussis*), ліпосоми та імуностимулюючі комплекси. Прикладами ад'ювантів є монофосфорил-ліпід-A (MPL SmithKline Beecham), сапоніни, такі як QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 і QS-L1 (So et al., 1997, Mol. Cells 7: 178-186), неповні ад'юванти Фрейнда, повні ад'юванти Фрейнда, вітамін Е, монтанід, галун, CPG олігонуклеотиди (Kxieg et al., 1995, Nature 374: 546-549) і різні емульсії вода-в-олії, які отримують з олій, які піддаються біологічному розкладанню, таких як сквалеон і/або Токоферол.

Відповідно до винаходу зразок може бути будь-яким зразком, придатним згідно даному

винаходу, зокрема, біологічним зразком, наприклад зразком тканини, включаючи рідини організму, і/або клітинним зразком, і може бути отриманий звичайним способом, наприклад шляхом біопсії тканини, включаючи біопсію пункції і шляхом узяття крові, бронхіального аспірата, слини, сечі, калу або інших рідин організму. Відповідно до винаходу термін "біологічний зразок" також включає фракції біологічних зразків.

Термін "антитіло" відноситься до глікопротеїну, який містить, щонайменше, два важкі (H) ланцюги і два легкі (L) ланцюги, взаємно-сполучені дисульфідними зв'язками, і включає будь-яку молекулу, яка містить антигензв'язуючу ділянку. Термін "антитіло" включає моноклональні антитіла та їх фрагменти або похідні, включаючи, без обмеження, людські моноклональні антитіла, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла, одноланцюгові антитіла, наприклад, scFv's і антигензв'язуючі фрагменти антитіл, такі як Fab і Fab1 фрагменти, а також включає всі рекомбінантні форми антитіл, наприклад, антитіла, експресовані в прокаріотах, неглікозильовані антитіла і будь-які антигензв'язуючі фрагменти антитіл і похідні, як описується тут. Кожен важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (позначається в описі VH) і константної області важкого ланцюга. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (позначається в описі VL) і константної області легкого ланцюга. Області VH і VL можна додатково підрозділити на області гіперваріабельності, які називаються ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які чергуються з ділянками, консервативнішими, які називаються каркасними ділянками (FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від амінокінця до карбоксикінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого і легкого ланцюга містять домен зв'язування, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканиною-«хазяїном» або чинниками, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи комплементу.

Відповідно до винаходу термін "щонайменше, одна з CDR послідовностей" бажано означає, щонайменше, CDR3 послідовність. Термін "CDR послідовності ланцюга антитіла" переважно має відношення до CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга або легкого ланцюга антитіла.

Згідно винаходу посилання на ланцюг антитіла, який містить конкретну CDR-послідовність, таку як окрема CDR3-послідовність, означає, що вказана окрема CDR-послідовність або утворює CDR-ділянку, таку як CDR3-ділянка вказаного ланцюга антитіла, тобто CDR-ділянка складається з вказаної окремої CDR-послідовності, або утворює частину CDR-ділянки, таку як CDR3- ділянка вказаного ланцюга антитіла, тобто CDR-ділянка містить вказану конкретну CDR-послідовність.

Якщо згідно винаходу робиться посилання на антитіло, яке містить окремий важкий ланцюг антитіла і/або окремий легкий ланцюг антитіла, наприклад, ланцюг, який містить конкретні CDR-послідовності, бажано, щоб обидва важкі ланцюги і/або обидва легкі ланцюги антитіла кожен складаються з окремого важкого ланцюга антитіла і/або окремого легкого ланцюга антитіла.

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до молекули, яка має ділянку зв'язування антигену, отриману в основному від імуноглобуліну тварини, яка не є людиною, при цьому в основі решти структури імуноглобулінової молекули лежить структура і/або послідовність людського імуноглобуліну. Ділянка зв'язування антигену може або містити повні варіабельні домени, приєднані до константних доменів, або тільки гіперваріабельні ділянки (CDR), приєднані до відповідних каркасних ділянок у варіабельних доменах. Ділянки зв'язування антигену можуть бути дикого типу або модифікованими однією або більше амінокислотними замінами, наприклад, модифікованими, щоб бути більше схожими на людський імуноглобулін. Деякі форми гуманізованих антитіл зберігають всі CDR-послідовності (наприклад, гуманізоване мишаче антитіло, яке містить всі шість CDR від мишачого антитіла). Інші форми мають один або більше CDR, змінених відносно первинного антитіла.

Термін "химерне антитіло" відноситься до антитіл, в яких одна частина кожної з амінокислотних послідовностей важкого і легкого ланцюгів є гомологічною до відповідних послідовностей в антитілі, отриманому від конкретного виду або яке належить до певного класу, тоді як решта сегменту ланцюга є гомологічним до відповідних послідовностей іншого виду. Зазвичай варіабельна ділянка і легкого і важкого ланцюгів копіює варіабельні ділянки антитіл, отриманих від одного виду ссавців, тоді як константні частини є гомологічними до послідовностей антитіл, отриманих від іншого виду. Однією очевидною перевагою таких химерних форм є те, що варіабельну ділянку можна легко отримати із відомих на даний час джерел, використовуючи досяжні В-клітини або гібридами від організмів-господарів, які не є людиною, в комбінації з константними областями, отриманими, наприклад, з препаратів клітин людини. Притому, що варіабельна область має перевагу легкості отримання, а джерело не

впливає на специфічність, константна область, будучи людською, менш ймовірно викличе імунну відповідь у суб'єкта-людини при введенні антитіл, ніж викликала б константна область з джерела, яке не є людиною. Проте визначення не обмежується цим окремим прикладом.

Термін "антигензв'язуюча ділянка" антитіла (або просто "ділянка зв'язування"), як він використовується в описі, відноситься до одного або більше фрагментів антитіла, які зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном. Показано, що антигензв'язуюча функція антитіла може здійснюватися фрагментами повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язуючих фрагментів, охоплені терміном "антигензв'язуюча ділянка" антитіла, включають (i) Fab фрагменти, одновалентні фрагменти, які складаються з VL, VH, CL і CH доменів; (ii) F(ab')₂ фрагменти, двовалентні фрагменти, які містять два Fab-фрагмента сполучені дисульфідним містком в шарнірній області; (iii) Fd фрагменти, які складаються з VH і CH доменів; (iv) Fv фрагменти, які складаються з VL і VH доменів одноланцюгових антитіл, (v) dAb фрагменти (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546), які складаються з VH домену; (vi) ізольовані гіперваріабельні ділянки (CDR) і (vii) комбінації двох або більше ізольованих CDR, які необов'язково можуть з'єднуватися синтетичним лінкером. Крім того, хоча два домени Fv фрагмента, VL і VH, кодуються окремими генами, їх можна з'єднати, використовуючи рекомбінантні методи, за допомогою синтетичних лінкерів, що дає їм можливість бути єдиним білковим ланцюгом, в якому VL і VH області розташовуються парами, щоб утворити одновалентні молекули (відомі як одноланцюгові Fv (scFv); дивися, наприклад, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; і Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також охоплені терміном "антигензв'язуюча ділянка" антитіла. Додатковим прикладом є домен-зв'язуючі гібридні імуноглобуліни, які містять (i) поліпептидний домен зв'язування, який приєднується до шарнірної області імуноглобуліну, (ii) константну область CH₂ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до шарнірної області і (iii) константну область CH₃ важкого ланцюга імуноглобуліну, приєднану до константної області CH₂. Зв'язуючий домен поліпептиду може бути варіабельною областю важкого ланцюга або варіабельною областю легкого ланцюга. Домен-зв'язуючі імуноглобулінові гібридні білки додатково розкриваються в US 2003/0118592 і US 2003/0133939. Ці фрагменти антитіл отримують за допомогою звичайних методів, відомих фахівцям в даній галузі техніки, при цьому фрагменти піддаються скринінгу щодо придатності, також, як і інтактні антитіла.

Термін "епітоп" відноситься до антигенної детермінанти в молекулі, тобто частини в молекулі, яка розпізнається імунною системою, наприклад, яка розпізнається антитілом. Наприклад, епітопи є окремими, тривимірними ділянками на антигені, які розпізнаються імунною системою. У контексті даного винаходу епітоп бажано походить від білка CLDN. Зазвичай епітопи складаються з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги цукрів, і зазвичай мають специфічні тривимірні структурні характеристики, а також специфічні характеристики заряду. Конформаційні і неконформаційні епітопи розрізняються тим, що зв'язування з першим, але не з другим, втрачається у присутності денатуруючих розчинників. Епітоп білка, такого як CLDN, бажано містить неперервну або перервану частину вказаного білка і складає бажано від 5 до 100, бажано від 5 до 50, краще від 8 до 30, найкраще від 10 до 25 амінокислот в довжину, наприклад, епітоп може мати бажано 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 або 25 амінокислот в довжину.

Термін "перерваний епітоп", як він використовується в описі, позначає конформаційний епітоп на білковому антигені, який утворюється, щонайменше, з двох окремих областей в первинній послідовності білка.

Термін "біспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид, або білковий або пептидний комплекс, який має дві різних специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні, і (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини. Термін "мультиспецифічна молекула" або "гетероспецифічна молекула" включає будь-який агент, наприклад, білок, пептид, або білковий або пептидний комплекс, який має більше ніж дві різних специфічності зв'язування. Наприклад, молекула може зв'язуватися з або взаємодіяти з (a) антигеном клітинної поверхні і (b) Fc-рецептором на поверхні ефektorної клітини і (c), щонайменше, з одним іншим компонентом. Відповідно, винахід включає, але не обмежується цим, біспецифічні, триспецифічні, тетраспецифічні та інші мультиспецифічні молекули, спрямовані до CLDN6, і до інших мішеней, таких як Fc-рецептори на ефektorних клітинах. Термін "біспецифічні антитіла" також включає діабоди (diabodies). Діабоди є двовалентними біспецифічними антитілами, в яких VH і VL домени експресуються на одному поліпептидному ланцюзі, але з використанням лінкера, який є дуже коротким, щоб дати можливість утворити пару двом доменам на одному і тому ж ланцюзі, таким чином, змушуючи домени утворювати пару з комплементарними доменами іншого

ланцюга і породжує дві антигензв'язуючих ділянки (дивися, наприклад, , Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Термін "гетероантитіла", як він використовується в описі, відноситься до двох або більше антитіл, їх похідним або антигензв'язуючим ділянкам, з'єднаним разом, щонайменше, двоє з
5 поміж яких мають різні специфічності. Ці різні специфічності включають специфічність зв'язування для Fc-рецептора на ефекторній клітині і специфічність зв'язування для антигену або епітопу на клітині-мішені, наприклад, пухлинній клітині.

Антитіла, описані тут, можуть бути людськими антитілами. Термін "людське антитіло", як він використовується в описі, включає антитіла, які мають варіабельну і константну області,
10 отримані від імунoglobulinових послідовностей людських зародкових ліній (germline). Людські антитіла, відповідно до винаходу, можуть включати амінокислотні залишки, які не кодуються імунoglobulinовими послідовностями людських зародкових ліній (наприклад, мутації, введені за допомогою випадкового або сайт-специфічного мутагенезу in vitro або за допомогою соматичної мутації in vivo).

Термін "моноклональне антитіло", як він використовується в описі, відноситься до препарату молекул антитіл з однорідним молекулярним складом. Моноклональне антитіло проявляє одну специфічність зв'язування і спорідненість до окремого епітопу. У одному варіанті здійснення моноклональні антитіла виробляються за допомогою гібридоми, яка включає В-клітину,
20 отриману від тварини, яка не є людиною, наприклад, миші, сполучену з іморталізованою клітиною.

Термін "рекомбінантні антитіла" як він використовується в описі включає всі антитіла, які виходять, експресуються, створюються або виділяються за допомогою рекомбінантних способів, наприклад, (а) антитіла, виділені з тварини (наприклад, миші), яка є трансгенною або трансхромосомною відносно генів імунoglobulinів, або гібридами, отриманої з них, (b) антитіла,
25 виділені з клітини-господаря, трансформованої для того, щоб вона експресувала антитіла, наприклад, з трансфектоми, (c) антитіла, виділені з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних антитіл, і (d) антитіла отримані, експресовані, створені або виділені будь-якими іншими способами, які зачіпають сплайсинг послідовностей генів імунoglobulinів з іншою ДНК-послідовністю.

Термін "трансфектома", як він використовується в описі, включає рекомбінантні еукаріотичні клітини-господарі, які експресують антитіло, такі як клітини CHO, клітини NS/O, клітини HEK293, клітини HEK293T, рослинні клітини або клітини грибів, включаючи клітини дріжджів.

Термін "гетерологічне антитіло, як він використовується в описі, визначається з огляду на трансгенний організм, який продукує таке антитіло. Цей термін відноситься до антитіла, яке має амінокислотну послідовність або кодованого нуклеїновокислотною послідовністю, яка відповідає послідовності, виявленій в організмі, який не є трансгенним організмом, і як правило, отриманому від іншого виду, ніж трансгенний організм.

Термін "гетерогібридне антитіло", як він використовується в описі, відноситься до антитіла, яке має легкий і важкий ланцюги від різних організмів. Наприклад, антитіло, яке має важкий ланцюг людини, сполучений з мишачим легким ланцюгом, є гетерогібридним антитілом.
40

Винахід включає всі антитіла і похідні антитіл, описані тут, які для цілей винаходу охоплюються терміном "антитіло". Термін "похідні антитіл" відноситься до будь-якої модифікованої форми антитіла, наприклад, кон'югату антитіла і іншого агента або антитіла або фрагмента антитіла.

Описані тут антитіла бажано є ізольованими. Термін "ізольоване антитіло", як він використовується в описі, відноситься до антитіла, яке в основному є вільним від інших антитіл, які мають інші антигенні специфічності (наприклад, ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з CLDN6, є в основному вільним від антитіл, які специфічно зв'язують антигени, відмінні від CLDN6). Проте ізольоване антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом,
50 ізоформою або варіантом людського CLDN6, може мати перехресну реактивність до інших споріднених антигенів, наприклад, від інших видів (наприклад, видовими гомологами CLDN6). Більш того, ізольоване антитіло може бути в основному вільним від іншого клітинного матеріалу і/або хімічних речовин. У одному варіанті здійснення винаходу комбінація "ізольованих" моноклональних антитіл має відношення до антитіл, які мають різні специфічності і об'єднані в чітко визначену композицію.
55

Згідно із даним винаходом антитіло здатне зв'язуватися з певною мішенню, якщо воно має значну спорідненість із зазначеною певною мішенню й зв'язується із зазначеною певною мішенню в стандартних методах дослідження, таких, як описуються тут. Краще коли антитіло здатне зв'язуватися з мішенню, якщо його зв'язування із зазначеною мішенню можна виявити за допомогою проточної цитометрії (за допомогою FACS аналізу), за допомогою якої визначають
60

зв'язування зазначеного антитіла із зазначеною мішенню, експресованою на поверхні інтактних клітин. Краще антитіло зв'язується із зазначеною мішенню, і цей зв'язок можливо зафіксувати, якщо воно присутнє у концентрації 10 мкг/мл або нижче, 5 мкг/мл або нижче або 2 мкг/мл або нижче. Краще антитіло зв'язується із зазначеною мішенню, і цей зв'язок можливо зафіксувати, якщо воно присутнє у концентрації 50 нМ або нижче, 30 нМ або нижче або 15 нМ або нижче. "Спорідненість" або "спорідненість зв'язування" часто оцінюється рівноважною константою дисоціації (K_D). Бажано термін "значна спорідненість" відноситься до зв'язування з певною мішенню з константою дисоціації (K_D) 10^{-5} М або нижче, 10^{-6} М або нижче, 10^{-7} М або нижче, 10^{-8} М або нижче, 10^{-9} М або нижче, 10^{-10} М або нижче, 10^{-11} М або нижче або 10^{-12} М або нижче. Антитіла запропоновані даним винаходом бажано мають значення EC_{50} для зв'язування з CLDN6 6500 нг/мл або нижче, 3000 нг/мл або нижче, 2500 нг/мл або нижче, 2000 нг/мл або нижче, 1500 нг/мл або нижче, 1000 нг/мл або нижче, 500 нг/мл або нижче, 400 нг/мл або нижче, 300 нг/мл або нижче, 200 нг/мл або нижче, або 100 нг/мл або нижче.

Антитіло не є здатним (значно) зв'язуватися з мішенню, якщо воно не має значної спорідненості із зазначеною мішенню й не зв'язується значно із зазначеною мішенню в стандартних методах. Краще антитіло не здатне (значно) зв'язуватися з мішенню, якщо його зв'язування із зазначеною мішенню не виявляється за допомогою проточної цитометрії (за допомогою FACS аналізу), за допомогою якої визначають зв'язування зазначеного антитіла із зазначеною мішенню, експресованою на поверхні інтактних клітин. Краще антитіло зв'язується із зазначеною мішенню, але цей зв'язок неможливо зафіксувати, якщо воно присутнє у концентрації до 2 мкг/мл, бажано до 5 мкг/мл, бажано до 10 мкг/мл, бажано до 20 мкг/мл, більш бажано до 50 мкг/мл, зокрема до 100 мкг/мл або до 150 мкг/мл, до 200 мкг/мл або вище. Краще антитіло зв'язується із зазначеною мішенню, і цей зв'язок неможливо зафіксувати, якщо воно присутнє у концентрації до 15 нМ, бажано до 30 нМ, бажано до 50 нМ, бажано до 100 нМ, бажано до 150 нМ або до 170 нМ, до 300 нМ, до 600 нМ, до 1000 нМ, до 1300 нМ або вище. Краще антитіло зв'язується із зазначеною мішенню, і цей зв'язок неможливо зафіксувати, якщо воно присутнє у концентрації, яка насичує зв'язування з мішенню, з якою зв'язується антитіло, тобто CLDN6. Краще антитіло не має значної спорідненості до мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_D , яка щонайменше, в 10-разів, 100-разів, 103-разів, 104-разів, 105-разів або 106-разів є вищою, ніж K_D зв'язування з певною мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, з якою здатне зв'язуватися антитіло, становить 10^{-7} М, тоді K_D зв'язування з мішенню, до якої антитіло не має значної спорідненості, становила б, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Антитіло є специфічним для певної мішені, якщо воно здатне зв'язуватися із зазначеною певною мішенню, тоді як воно не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, тобто має незначну спорідненість до інших мішеней і незначно зв'язується з іншими мішенями при стандартних методах аналізу. Згідно з винаходом антитіло є специфічним до CLDN6, якщо воно здатне зв'язуватися з CLDN6, але не здатне зв'язуватися з іншими мішенями, зокрема, білками клаудинами, відмінними від CLDN6, такими як CLDN9, CLDN4, CLDN3 і CLDN1. Краще антитіло є специфічним до CLDN6, якщо спорідненість і зв'язування з білком клаудином, відмінним від CLDN6, таким як CLDN9, CLDN4, CLDN3 і CLDN1, не перевищує значно спорідненості до або зв'язування з білками, неспорідненими із клаудином, такими як бичачий сироватковий альбумін (BSA), казеїн, людський сироватковий альбумін (HSA) або трансмембранні білки, які не є клаудинами, такі як молекули МНС або рецептор трансферину або будь-який інший специфічний поліпептид. Краще антитіло є специфічним для певної мішені, якщо воно зв'язується із зазначеною мішенню з K_D , яка щонайменше, в 10-разів, 100-разів, 103-разів, 104-разів, 105-разів або 106-разів є нижчою, ніж K_D зв'язування з мішенню, яка не є специфічною. Наприклад, якщо K_D зв'язування антитіла з мішенню, яка є специфічною становить 10^{-7} М, то K_D зв'язування з мішенню, яка не є специфічною, має бути, щонайменше, 10^{-6} М, 10^{-5} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М або 10^{-1} М.

Зв'язування антитіла з мішенню можна визначити експериментально, використовуючи будь-який придатний метод, див., наприклад, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Jam's Immunology, W. H. Freeman і Company New York, N Y (1992), і описані тут методи. Спорідненість можна легко визначити за допомогою звичайних методів, таких як рівноважний діаліз; за допомогою приладу Biorad 2000, використовуючи загальні методи, запропоновані виробником; за допомогою радіоімунологічного аналізу з використанням міченого радіоактивним ізотопом цільового антигену або іншими методами, відомими фахівцям. Дані про спорідненість можна проаналізувати, наприклад, за допомогою методу Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). Визначена спорідненість окремої взаємодії антитіло-антиген може варіювати, якщо

вимірювання проводилося за різних умов, наприклад, концентрації солі, pH. Таким чином, вимірювання спорідненості й інших параметрів зв'язування антигену, наприклад, K_D , IC_{50} , бажано проводяться за допомогою стандартизованих розчинів антитіла й антигену й стандартизованого буфера.

5 Унікальною властивістю антитіла запропонованого даним винаходом є здатність зв'язуватися із клаудином 6 на клітинній поверхні. Це продемонстровано за допомогою проточної цитометрії на клітинах, які експресують клаудин 6.

Для перевірки зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують клаудини, використовували проточну цитометрію. Коротко, клітинні лінії, які експресують мембранозв'язані клаудини (вирощені за стандартних умов росту), змішуються з різними концентраціями антитіл в PBS, що містить 2 % інактивованої нагріванням FCS і 0,1 % NaN_3 при 4 °C протягом 30 хвилин. Після промивання клітини вступають в реакцію із вторинним антитілом, міченим флуоресцентною міткою за тих же самих умов, за яких проводилося фарбування первинного антитіла. Зразки досліджували методом FACS з використанням висвітлення й параметрів бічного світлорозсіювання для пропускання одиничних клітин, при цьому визначається зв'язування мічених антитіл.

Термін "зв'язування" відповідно до винаходу бажано має відношення до специфічного зв'язування, як визначено тут.

20 Термін "ізотип", як він використовується в описі, відноситься до класу антитіл (наприклад, IgM або IgG 1), які кодується генами константної області важкого ланцюга.

Вираз "перемикання ізотипу", як він використовується в описі, відноситься до явища, за допомогою якого клас або ізотип антитіла змінюється від одного класу Ig до одного з інших класів Ig.

25 Термін "природний", як він використовується в описі відносно до об'єкта, стосується тієї обставини, що об'єкт може бути знайдений у природі. Наприклад, поліпептидна або полінуклеотидна послідовність, яка є присутньою в організмі (включаючи віруси), яка може бути виділена із природного джерела, і яка не була навмисно модифікована людиною в лабораторії, є природною.

30 Термін "перегрупувана", як він використовується в описі, відноситься до конфігурації важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобулінового локусу, у якому V сегмент розташовується безпосередньо поруч із D-J або J сегментом у конформації, яка кодує фактично повний VH або VL домен, відповідно. Перегрупований генний локус імуноглобуліну (антитіла) може бути встановлений шляхом порівняння із зародковою ДНК; перегрупований локус буде мати, щонайменше, один рекомбінований семичленний/дев'ятичленний гомологічний елемент.

35 Термін "перегрупувана" або "зародкова конфігурація", як він використовується в описі, у відношенні V сегмента стосується конфігурації, у якій V сегмент є нерекомбінованим для того, щоб знаходився безпосередньо поруч із D або J сегментом.

40 Термін "нуклеїновокислотна молекула", як він використовується в описі, включає молекули ДНК і молекули РНК. Нуклеїновокислотна молекула може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але бажано є дволанцюговою ДНК. Нуклеїновокислотна молекула може використовуватися для введення в клітину, тобто трансфекції клітини, наприклад, у формі РНК, яку можна одержати за допомогою транскрипції *in vitro* з матриці ДНК. Більше того, РНК може бути модифікована перед використанням шляхом стабілізації послідовності, кепінгу й поліаденілювання.

45 Нуклеїнові кислоти, описані згідно з винаходом, бажано є ізольованими. Термін "ізольована нуклеїнова кислота" означає згідно з винаходом, що нуклеїнова кислота була (i) ампліфікована *in vitro*, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), (ii) отримана рекомбінантно шляхом клонування, (iii) очищена, наприклад, за допомогою розщеплення й гель-електрофоретичного фракціонування або (iv) синтезована, наприклад, за допомогою хімічного синтезу. Ізольована нуклеїнова кислота є нуклеїновою кислотою, яка є доступною для маніпуляцій за допомогою технології рекомбінантних ДНК.

50 Нуклеїнові кислоти згідно з винаходом присутні окремо або в комбінації з іншими нуклеїновими кислотами, які можуть бути гомологічними або гетерологічними. У кращих варіантах здійснення нуклеїнові кислоти є функціонально пов'язаними з послідовностями, які контролюють експресію, які можуть бути гомологічними або гетерологічними у відношенні зазначеної нуклеїнової кислоти, при цьому термін "гомологічні" означає, що нуклеїнова кислота також є функціонально зв'язаною з послідовністю, яка природно контролює експресію, а термін "гетерологічні" означає, що нуклеїнова кислота не є функціонально зв'язаною з послідовністю, яка природно контролює експресію.

60 Нуклеїнова кислота, така як нуклеїнова кислота, що експресує РНК і/або білок або пептид, і

послідовність, яка контролює експресію, є "функціонально" зв'язаними один з одним, якщо вони ковалентно зв'язані один з одним таким чином, що експресія або транскрипція зазначеної нуклеїнової кислоти перебуває під контролем або під впливом зазначеної послідовності, що контролює експресію. Якщо нуклеїнова кислота повинна транслюватися у функціональний білок, тоді, за наявності послідовності, що контролює експресію, пов'язаної з кодувальною послідовністю, індукція зазначеної послідовності, що контролює експресію, викликає транскрипцію зазначеної нуклеїнової кислоти, не викликаючи зрушення рамки в кодувчій послідовності, або зазначена кодувча послідовність не здатна транслюватися в бажаний білок або пептид.

Термін "послідовність, яка контролює експресію" включає згідно з винаходом промотори, ділянки зв'язування рибосом, енхансери та інші елементи контролю, які регулюють транскрипцію гена або трансляцію мРНК. В окремих варіантах здійснення винаходу послідовності, які контролюють експресію, можуть регулюватися. Точна структура послідовності, яка контролює експресію, може змінюватися залежно від виду або типу клітин, але як правило, містить 5'-нетранскрибовану й 5'- і 3'-нетрансльовані послідовності, які задіяні в ініціації транскрипції й трансляції, відповідно, такі як ТАТА-бокс, кепінг-послідовність, СААТ послідовність тощо. Конкретніше, 5'-нетранскрибовані послідовності, які контролюють експресію, містять промоторну область, яка включає промоторну послідовність для транскрипційного контролю функціонально зв'язаної нуклеїнової кислоти. Послідовності, які контролюють експресію, також можуть містити енхансерні послідовності або послідовності активації.

Згідно з винаходом термін "промотор" або "промоторна область" має відношення до нуклеїновокислотної послідовності, яка розташовується вище (upstream) (5') відносно експресованої нуклеїновокислотної послідовності й контролює експресію послідовності, забезпечуючи розпізнавання й сайт зв'язування для РНК-полімерази. "Промоторна область" може включати додатковий сайт розпізнавання й зв'язування для додаткових факторів, які залучені в процес регуляції транскрипції гена. Промотор може контролювати транскрипцію прокариотичного або еукаріотичного гена. Крім того, промотор може бути "індуцибельним" і може ініціювати транскрипцію у відповідь на індукуючий агент або може бути "конститутивним", якщо транскрипція не контролюється індукуючим агентом. Ген, який перебуває під контролем індукцибельного промотору, не експресується або експресується тільки в невеликому ступені, якщо відсутній індукуючий агент. У присутності індукуючого агента включається ген або збільшується рівень транскрипції. Загалом, це опосередковує зв'язуванням специфічного фактора транскрипції.

Промотори, які згідно з винаходом є кращими, включають промотори для SP6, T3 і T7 полімерази, людський U6 РНК промотор, CMV-промотор та їх штучні гібридні промотори (наприклад, CMV), де частина або частини з'єднуються із частиною або частинами промоторів генів інших клітинних білків, наприклад, таких як людський GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа), і включаючи або не включаючи додатковий інтрон(и).

Згідно з винаходом термін "експресія" використовується в його найбільш загальному значенні й включає продукування РНК або РНК і білка/пептиду. Він також включає часткову експресію нуклеїнових кислот. Більше того, експресія може здійснюватися тимчасово або стабільно. Згідно з винаходом термін експресія також включає "аберантну експресію" або "аномальну експресію".

"Аберантна експресія" або "аномальна експресія" означає згідно з винаходом, що експресія є зміненою, бажано підвищеною, у порівнянні з еталонною, бажано в порівнянні зі станом у неонкогенній нормальній клітині або у здорового індивідуума. Збільшення експресії розуміють як збільшення, щонайменше, на 10 %, зокрема, щонайменше, на 20 %, щонайменше, на 50 % або, щонайменше, на 100 %. В одному варіанті здійснення експресії виявляється тільки в порушеній хворобою тканині, у той час як експресія в здоровій тканині пригнічується.

У кращому варіанті здійснення нуклеїновокислотна молекула згідно з винаходом присутня у векторі, у відповідних випадках із промотором, який контролює експресію нуклеїнової кислоти. Термін "вектор" використовується тут у його самому загальному значенні й включає будь-який проміжний переносник нуклеїнової кислоти, який дає можливість зазначеній нуклеїновій кислоті, наприклад, бути внесений в прокариотичні й/або еукаріотичні клітини й, за необхідності, інтегруватися в геном. Вектори цього сорту бажано є реплікованими й/або експресуються в клітинах. Вектори включають плазмідні, фагміди, бактеріофаги або вірусні геноми. Термін "плазмід" як він використовується в описі, загалом, має відношення до конструкта екстрахромосомного генетичного матеріалу, звичайно дуплекса кільцевої ДНК, який може реплікуватися незалежно від хромосомної ДНК.

Як вектор для експресії антитіла може використовуватися або тип вектора, у якому важкий

ланцюг антитіла й легкий ланцюг присутні в різних векторах, або тип вектора, у якому важкий ланцюг і легкий ланцюг присутні в тому самому векторі.

Запропоновану в описі ідею у відношенні нуклеїновокислотної і амінокислотної послідовностей, наприклад, зазначених у списку послідовностей, слід також відносити до модифікацій (тобто варіантів) зазначених специфічних послідовностей, які дають у результаті послідовності, які є функціонально еквівалентними до зазначених специфічних послідовностей, наприклад, амінокислотних послідовностей, які проявляють властивості, ідентичні або подібні до властивостей специфічних амінокислотних послідовностей і нуклеїновокислотні послідовності, які кодують амінокислотні послідовності, які проявляють властивості, ідентичні або подібні до властивостей амінокислотних послідовностей, які кодуються специфічними нуклеїновокислотними послідовностями. Однією важливою властивістю є збереження зв'язування антитіла з його мішенню або забезпечення ефекторних функцій антитіла, таких як CDC і/або ADCC. Бажано послідовність, модифікована у відношенні специфічної послідовності, коли вона заміняє специфічну послідовність в антитілі, зберігає зв'язування зазначеного антитіла з мішенню й бажано функції зазначеного антитіла, як описано тут.

Подібним чином, наведену тут ідею відносно специфічних антитіл або гібридом, які продукують специфічні антитіла, слід тлумачити таким чином, щоб також відносити її до антитіла, що характеризується амінокислотою послідовністю й/або нуклеїновокислотою послідовністю, яка є модифікованою в порівнянні з амінокислотою послідовністю й/або нуклеїновокислотою послідовністю специфічних антитіл, але є функціонально еквівалентною. Однією важливою властивістю є збереження зв'язування антитіла з його мішенню або здійснення ефекторних функцій антитіла. Бажано послідовність, модифікована у відношенні специфічної послідовності, коли вона заміняє специфічну послідовність в антитілі, зберігає зв'язування зазначеного антитіла з мішенню й бажано функції зазначеного антитіла, як описано тут, наприклад, CDC-опосередкований лізис або ADCC-опосередкований лізис.

Зокрема, фахівцям ясно, що послідовності CDR, гіперваріабельні й варіабельні області можуть бути модифіковані без втрати здатності зв'язуватися з мішенню. Наприклад, CDR-ділянки будуть або ідентичними або високогомологічними до областей антитіл, перерахованих тут. Під "високогомологічною" мають на увазі, що в CDR може бути зроблено від 1 до 5, бажано від 1 до 4, наприклад, від 1 до 3 або 1 або 2 заміни. На додачу до цього гіперваріабельні й варіабельні ділянки можуть бути модифіковані таким чином, щоб вони демонстрували значну гомологію з ділянками антитіл, спеціально розкритих тут.

Слід розуміти, що описані тут специфічні нуклеїнові кислоти також включають нуклеїнові кислоти, модифіковані заради оптимізації частоти використання кодону в окремій клітині-хазяїні або організмі. Відмінності в частоті використання кодону між організмами може приводити до ряду проблем, які стосуються гетерологічної генної експресії. Оптимізація кодону зміною одного або більше нуклеотидів первісної послідовності може дати в результаті оптимізацію експресії нуклеїнової кислоти, зокрема, оптимізацію ефективності трансляції, у гомологічному або гетерологічному хазяїні, у якому повинна експресуватися зазначена нуклеїнова кислота.

Згідно з винаходом варіант, похідне, модифікована форма або фрагмент нуклеїновокислотної послідовності, амінокислотна послідовність або пептид бажано має функціональну властивість нуклеїновокислотної послідовності, амінокислотної послідовності або пептиду, відповідно, з якого він був отриманий. Такі функціональні властивості включають взаємодію з або зв'язування з іншими молекулами. В одному варіанті здійснення варіант, похідне, модифікована форма або фрагмент нуклеїновокислотної послідовності, амінокислотна послідовність або пептид є імунологічно еквівалентним до нуклеїновокислотної послідовності, амінокислотної послідовності або пептиду, відповідно, з якого він був отриманий.

Бажано ступінь ідентичності між специфічною нуклеїновокислотою послідовністю й нуклеїновокислотою послідовністю, яка є модифікованою у відношенні або яка є варіантом зазначеної специфічної нуклеїновокислотної послідовності, становить, щонайменше, 70 %, бажано, щонайменше, 75 %, більш бажано, щонайменше, 80 %, ще краще, щонайменше, 90 % або найкраще, щонайменше, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Що стосується CLDN 6-нуклеїновокислотних варіантів, то ступінь ідентичності бажано становить, щонайменше, близько 300, щонайменше, близько 400, щонайменше, близько 450, щонайменше, близько 500, щонайменше, близько 550, щонайменше, близько 600 або, щонайменше, близько 630 нуклеотидів. У кращих варіантах здійснення ступінь ідентичності дається для повної довжини еталонної нуклеїновокислотної послідовності, наприклад, нуклеїновокислотних послідовностей, наведених у переліку послідовностей. Бажано дві послідовності є здатними гібридизуватися й утворювати стабільний дуплекс один з одним, коли гібридизацію бажано проводять за умов, які забезпечують специфічну гібридизацію між полінуклеотидами (жорсткі умови). Жорсткі умови

описуються, наприклад, в Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Editors, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 або Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., New York і стосуються, наприклад, гібридизації при 65 °C у буфері для гібридизації (3,5 × SSC, 0,02 % фіколу, 0,02 % полівінілпіролідону, 0,02 % бичачого сироваткового альбуміну, 2,5 мМ NaH₂PO₄ (ph 7), 0,5 % SDS, 2 мМ EDTA). SSC є 0,15M хлоридом натрію/0,15M цитратом натрію, pH 7. Після гібридизації мембрану, на яку була перенесена ДНК, промивають, наприклад, в 2 × SSC за кімнатної температури, а потім в 0,1-0,5 × SSC/0,1 × SDS за температур до 68 °C.

Термін "варіант" згідно з винаходом також включає мутанти, сплайс-варіанти, конформації, ізоформи, алельні варіанти, видові варіанти й видові гомологи, зокрема ті, які присутні від природи. Алельний варіант має відношення до зміни в нормальній послідовності гена, значення якої часто є неясним. Повне генетичне секвенування часто встановлює численні алельні варіанти для даного гена. Видовий гомолог є нуклеїновою кислотою або амінокислотою послідовністю, джерелом походження яких є інші види, ніж у нуклеїновокислотної або амінокислотної послідовності.

Для цілей даного винаходу "варіанти" амінокислотної послідовності включають варіанти амінокислотних вставок, варіанти амінокислотних добавок, варіанти амінокислотних делецій і/або варіанти амінокислотних заміни. Варіанти амінокислотних делецій, що містять делецію на N-кінці й/або C-кінці білка, також називаються N-кінцевими й/або C-кінцевими укороченими варіантами.

Варіанти амінокислотних вставок включають вставки однієї або двох або більше амінокислот в окрему амінокислотну послідовність. У випадку варіантів, які мають вставку, амінокислотної послідовності в окрему ділянку амінокислотної послідовності вставляється один або більше амінокислотних залишків, хоча при відповідному скринінгу отриманого продукту також можна виявити випадкові вставки.

Варіанти амінокислотних добавок включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття однієї або більше амінокислот, такі як 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот.

Варіанти амінокислотних делецій характеризуються видаленням однієї або більше амінокислот з послідовності, наприклад, видаленням 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 або більше амінокислот. Делеції можуть відбуватися в будь-якому місці білка.

Варіанти амінокислотних заміни характеризуються, щонайменше, видаленням одного залишку в послідовності й вставкою іншого залишку на його місце. Перевага надається модифікаціям, які перебувають у положеннях амінокислотної послідовності, які не є консервативними між гомологічними білками або пептидами, і/або замінам амінокислот на інші амінокислоти, які мають подібні властивості. Бажано амінокислотні зміни в білкових варіантах є консервативними амінокислотними змінами, тобто замінами так само заряджених або незаряджених амінокислот. Консервативна зміна амінокислоти стосується заміни однієї із родини амінокислот, які є спорідненими за структурою бічного ланцюга. Природні амінокислоти підрозділяються на чотири родини: кислі (аспартат, глутамат), основні (лізин, аргінін, гістидин), неполярні (аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан) і незаряджені полярні (гліцин, аспарагін, глутамін, цистеїн, серин, треонін, тирозин) амінокислоти. Фенілаланін, триптофан і тирозин іноді класифікуються разом як ароматичні амінокислоти.

Бажано ступінь подібності, краще ідентичності між специфічною амінокислотою послідовністю й амінокислотою послідовністю, яка є модифікованою у відношенні до або яка є варіантом зазначеної специфічної амінокислотної послідовності, наприклад, між амінокислотними послідовностями, що демонструють істотну гомологію, буде становити, щонайменше, 70 %, бажано, щонайменше, 80 %, ще краще, щонайменше, 90 % або найкраще, щонайменше, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. Ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться для амінокислотної області, яка становить, щонайменше, близько 10 %, щонайменше, близько 20 %, щонайменше, близько 30 %, щонайменше, близько 40 %, щонайменше, близько 50 %, щонайменше, близько 60 %, щонайменше, близько 70 %, щонайменше, близько 80 %, щонайменше, близько 90 % або близько 100 % повної довжини еталонної амінокислотної послідовності. Наприклад, якщо еталонна амінокислотна послідовність складається з 200 амінокислот, ступінь подібності або ідентичності бажано приводиться, щонайменше, приблизно для 20, щонайменше, приблизно 40, щонайменше, приблизно 60, щонайменше, приблизно 80, щонайменше, приблизно 100, щонайменше, приблизно 120, щонайменше, приблизно 140, щонайменше, приблизно 160, щонайменше, приблизно 180 або приблизно для 200 амінокислот, бажано неперервних амінокислот. Що стосується CLDN 6-поліпептидних варіантів, ступінь подібності або ідентичності приводиться

бажано для ділянки, щонайменше, близько 100, щонайменше, близько 120, щонайменше, близько 140, щонайменше, близько 160, щонайменше, близько 180, щонайменше, близько 200 або, щонайменше, близько 210 амінокислот. У кращих варіантах здійснення ступінь подібності або ідентичності приводиться для повної довжини еталонної амінокислотної послідовності, наприклад, амінокислотних послідовностей, наведених у списку послідовностей. Вирівнювання для визначення подібності послідовності, бажано ідентичності послідовності, можна виконати відомими в даній галузі техніки способами, бажано з використанням найкращого способу вирівнювання послідовності, наприклад, Align з використанням стандартних налаштувань, бажано EMBOSS:needle, Матриця: Blosum62, Штраф за відкриття пробілу 10.0, Штраф за продовження пробілу 0.5.

"Подібність послідовності" указує відсоток амінокислот, які або є ідентичними або які представляють консервативні амінокислотні заміни. "Ідентичність послідовності" між двома поліпептидними або нуклеїновокислотними послідовностями вказує відсоток амінокислот або нуклеотидів, які є ідентичними між послідовностями.

"Відсоток ідентичності" отримують після виконання оптимального вирівнювання, цей відсоток є чисто статистичним, а відмінності між двома послідовностями розподіляються випадково і вздовж повної їх довжини. Порівняння послідовності між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями зазвичай здійснюється шляхом порівняння цих послідовностей після їх оптимального вирівнювання, вказане порівняння проводиться за допомогою сегменту або "вікна порівняння" для того, щоб встановити і порівняти локальні області схожості послідовності. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння може бути проведене, окрім способу вручну, за допомогою алгоритму локальної гомології Smith і Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, за допомогою алгоритму локальної гомології Neddleman і Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, за допомогою методу пошуку схожості Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, або за допомогою комп'ютерних програм із застосуванням цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N і TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

Відсоток ідентичності обчислюється шляхом визначення числа ідентичних положень між двома послідовностями при порівнянні, діленням цього числа на число порівнюваних положень і множенням отриманого результату на 100 для того, щоб отримати відсоток ідентичності між цими двома послідовностями.

"Консервативні заміни" можуть бути зроблені, наприклад, на основі схожості полярності, заряду, розчинності, гідрофобності, гідрофільності і/або аліфатичної природи залучених залишків. Наприклад, (a) неполярні (гідрофобні) амінокислоти включають аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан і метіонін; (b) полярні нейтральні амінокислоти включають гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін і глутамін; (c) позитивно заряджені (основні) амінокислоти включають аргінін, лізин і гістидин; і (d) негативно заряджені (кислі) амінокислоти включають аспарагінову кислоту і глутамінову кислоту. Як правило, заміни можуть бути зроблені в групах (a) -(d). Крім того, гліцин і пролін можуть бути замінені один іншим, виходячи з їх здатності розривати α -спіралі. Деякі кращі заміни можуть бути зроблені серед наступних груп: (i) S і T; (ii) P і G; і (iii) A, V, L і I. Якщо генетичний код відомий, за допомогою технології рекомбінантних і синтетичних ДНК кваліфікований учений легко може створити ДНК, яка кодує консервативні амінокислотні варіанти.

Даний винахід включає антитіла, в яких можуть бути зроблені зміни в Fc-ділянці для зміни функціональних і фармакокінетичних властивостей антитіл. Такі зміни можуть привести до зменшення або збільшення Clq-зв'язування і CDC або Fc γ R-зв'язування і ADCC. Заміни можуть бути зроблені, наприклад, в одному або більше амінокислотних залишках константної області важкого ланцюга, тим самим викликаючи зміну ефекторної функції, і одночасно зберігаючи здатність зв'язуватися з антигеном в порівнянні з модифікованим антитілом, див. US 5,624,821 і US 5,648,260.

Час напівжиття антитіла *in vivo* може бути покращений шляхом модифікації епітопу рятувального (salvage) рецептора константного домену Ig або Ig-подібного константного домену, так що молекула не містить інтактний домен або інтактну Ig Fc CH2 ділянку, див. US 6,121,022 і US 6,194,551. Час напівжиття *in vivo* може бути додатково збільшений за допомогою здійснення мутацій на Fc ділянці, наприклад, шляхом заміни треоніну на лейцин в положенні 252, шляхом заміни треоніну на серин в положенні 254, або шляхом заміни треоніну на фенілаланін в положенні 256, див. US 6,27,375.

Більше того, з метою зміни ефекторної функції антитіл може бути модифікований глікозильований варіант антитіл. Наприклад, антитіла можуть експресуватися в трансфектомі,

яка не приєднує фукозну одиницю, зазвичай приєднану до Asp в положенні 297 Fc-ділянки, для того, щоб підсилити спорідненість Fc- ділянки із Fc-рецептором, яка, у свою чергу, приводитиме до підвищеної ADCC антитіл у присутності NK-клітин, див. Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733. Більше того, галактозилування може бути зроблене з метою модифікувати CDC.

5 Альтернативно, в іншому варіанті здійснення мутації можуть бути введені випадково уздовж всієї або частини послідовності, яка кодує анти-CLDN6 антитіло, наприклад, за допомогою насичу вального мутагенезу і може бути проведений скринінг отриманих модифікованих анти-CLDN6 антитіл відносно активності зв'язування.

10 Згідно винаходу термін "клітина" або "клітина-господар" бажано має відношення до інтактної клітини, тобто клітини з інтактною мембраною, яка не вивільняє нормальні внутрішньоклітинні компоненти, такі як ферменти, органели або генетичний матеріал. Інтактна клітина бажано є живою клітиною, тобто живою клітиною, здатною виконувати свої нормальні метаболічні функції. Бажано вказаний термін згідно винаходу має відношення до будь-якої клітини, яка може бути трансформована або трансфікована екзогенною нуклеїновою кислотою. Термін "клітина"

15 включає згідно винаходу прокаріотичні клітини (наприклад, E. coli) або еукаріотичні клітини (наприклад, дендритні клітини, В-клітини, CHO клітини, COS клітини, K562 клітини, HEK293 клітини, клітини HELA, дріжджові клітини і клітини комах). Усередині клітини можна виявити екзогенну нуклеїнову кислоту (i) окремо як таку у вільно диспергованому вигляді, (ii) введену в рекомбінантний вектор або (iii) інтегровану в геном клітини-господаря або мітохондріальну ДНК.

20 Особливо бажаними є клітини ссавців, наприклад, клітини людини, мишей, хом'яків, свиней, кіз і приматів. Клітини можуть бути отримані з цілого ряду типів тканин і включають первинні клітини і клітинні лінії. Конкретні приклади включають кератиноцити, лейкоцити периферійної крові, стоволові клітини кісткового мозку і ембріональні стоволові клітини. У додаткових варіантах здійснення клітина є антиген-презентуючою клітиною, зокрема дендритною клітиною, моноцитом або макрофагом. Термін "клітина-господар" як він використовується в описі бажано

25 призначається для вказування клітини, в яку може бути введенний рекомбінантний вектор експресії.

Клітина, яка містить нуклеїновокислотну молекулу, бажано експресує пептид або білок, закодований нуклеїновою кислотою.

30 Термін "трансгенна тварина" відноситься до тварини, яка має геном, який містить один або більше трансгенів, бажано трансгенів важкого і/або легкого ланцюга, або трансхромосом (або інтегрованих або неінтегрованих в природну ДНК генома тварини), бажано здатних експресувати трансгени. Наприклад, трансгенна миша може мати трансген людського легкого ланцюга і або трансген людського важкого ланцюга або трансхромосому людського важкого ланцюга, так що миша продукує людські анти-CLDN6 антитіла, коли вона імунізована CLDN6-антигеном і/або клітинами, які експресують CLDN6. Трансген людського важкого ланцюга може бути інтегрований в хромосомну ДНК миші, як у випадку трансгенної миші, наприклад, HuMAb миші, наприклад HCo7 або HCoI2 миші, або трансген людського важкого ланцюга може бути збережений екстрахромосомно, як у випадку трансхромосомних (наприклад, KM) мишей, як

40 описано в WO 02/43478. Такі трансгенні і трансхромосомні миші можуть бути здатні продукувати багато ізотипів людських моноклональних антитіл до CLDN6 (наприклад, IgG, IgA і/або IgE) при проведенні V-D-J рекомбінації і перемикання ізотипу.

Термін "зменшити" або "інгібувати", як він використовується в описі, означає здатність викликати повне зменшення, бажано на 5 % або більше, 10 % або більше, 20 % або більше, краще 50 % або більше і найкраще на 75 % або більше рівня, наприклад, рівня проліферації клітин. Термін "інгібувати" або подібні вирази включають повне або практично повне інгібування, тобто зменшення до нуля або практично до нуля.

Такі терміни як "збільшення" або "посилення" переважно відносяться до збільшення або посилення, щонайменше, приблизно на 10 %, бажано, щонайменше, на 20 %, бажано, щонайменше, на 30 %, краще, щонайменше, на 40 %, краще, щонайменше, на 50 %, ще краще, щонайменше, на 80 % і найкраще, щонайменше, на 100 %. Ці терміни також можуть мати відношення до обставин, за яких під час початку відліку (у точці нуля) не існує помітного сигналу відносно певного з'єднання або умови, а в певний момент часу, пізніше, ніж початок відліку, є помітний сигнал або умова.

55 Термін "імунологічно еквівалентний" означає, що імунологічно еквівалентна молекула, наприклад, імунологічно еквівалентна амінокислотна послідовність, проявляє однакові або в основному однакові імунологічні властивості і/або має однаковий або в основному однаковий імунологічний вплив, наприклад, відносно типу імунологічної дії, такої як індукція гуморальної і/або клітинної імунної відповіді, сили і/або тривалості індукованої імунної реакції або

60 специфічності імунної реакції. У контексті даного винаходу термін "імунологічно еквівалентний"

переважно використовується відносно імунологічних дій або властивостей пептиду або пептидного варіанту, використаного для імунізації. Конкретною імунологічною властивістю є здатність зв'язуватися з антитілами і, якщо буде потрібно, викликати імунну відповідь, бажано шляхом стимулювання продукування антитіл. Наприклад, амінокислотна послідовність є імунологічно еквівалентною до еталонної амінокислотної послідовності, якщо вказана амінокислотна послідовність при контакті з імунною системою суб'єкта викликає імунну реакцію, бажано продукування антитіл, які проявляють специфічність вступу в реакцію з еталонною амінокислотною послідовністю, такою як еталонна амінокислотна послідовність, яка утворює частину CLDN6.

Термін "іммунні ефекторні функції" в контексті даного винаходу включає будь-які функції, опосередковані компонентами імунної системи, які призводять до інгібування зростання пухлини і/або інгібуванню розвитку пухлини, включаючи інгібування поширення пухлини і метастазування. Бажано іммунні ефекторні функції призводять до знищення клітин пухлини. Бажано іммунні ефекторні функції в контексті даного винаходу є антитіло-опосередкованими ефекторними функціями. Такі функції включають комплементзалежну цитотоксичність (CDC), антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC), індукцію апоптозу в клітинах, які несуть асоційований з пухлиною антиген, наприклад, шляхом з'єднання антитіла з поверхнею антигену, і/або інгібування проліферації клітин, які несуть асоційований з пухлиною антиген, бажано ADCC і/або CDC. Таким чином, антитіла, здатні опосередкувати один або більше іммунних ефекторних функцій бажано є здатними опосередкувати знищення клітин, викликаючи CDC-опосередкований лізис, ADCC-опосередкований лізис, апоптоз, гомотипічну адгезію і/або фагоцитоз, бажано викликаючи CDC-опосередкований лізис і/або ADCC-опосередкований лізис. Крім того, антитіла можуть діяти просто шляхом зв'язування з пухлинно-асоційованими антигенами на поверхні пухлинної клітини. Наприклад, антитіла можуть блокувати функцію антигену, який асоціюється з пухлиною, або викликати апоптоз тільки шляхом зв'язування з пухлинно-асоційованим антигеном на поверхні пухлинної клітини.

Докладний опис винаходу

Механізми дії mAb

Не дивлячись на те, що наступний опис представляє аналіз механізму, який лежить в основі терапевтичної ефективності антитіл запропонованих даним винаходом, він не повинен розглядатися як такий, що обмежує винахід яким би то не було чином.

Описані тут антитіла можуть взаємодіяти з компонентами імунної системи, бажано через ADCC або CDC. Антитіла запропоновані винаходом також можуть використовуватися для "цільового навантаження" (наприклад, радіоізотопами, лікарськими засобами або токсинами), для того, щоб безпосередньо знищувати пухлинні клітини, або можуть використовуватися синергічно разом з традиційними засобами хіміотерапії, впливаючи на пухлини за допомогою додаткових механізмів дії, включаючи протипухлинні іммунні відповіді, які можуть бути порушені внаслідок побічних цитотоксичних ефектів препаратів хіміотерапії на Т-лімфоцити. Проте антитіла запропоновані винаходом також можуть діяти просто шляхом зв'язування з CLDN6 на клітинній поверхні, таким чином, наприклад, блокуючи проліферацію клітин.

Антитілозалежна клітинна цитотоксичність

ADCC є здатністю ефекторних клітин (зокрема лімфоцитів) знищувати клітини, при цьому для функціонування лімфоцитів необхідно, щоб клітина-мішень була помічена антитілом.

Бажано ADCC спостерігається, коли антитіла зв'язуються з антигенами на пухлинних клітинах, а Fc-домени антитіл зв'язують Fc-рецептори (FCR) на поверхні іммунних ефекторних клітин. Було встановлено декілька родин Fc-рецепторів, при цьому характерно, що специфічні популяції клітин експресують певні Fc-рецептори. ADCC можна розглядати як механізм прямої індукції руйнування (різного ступеню) пухлини, який приводить до презентації антигену та індукції Т-клітинних відповідей, направлених на пухлину. Бажано індукція ADCC in vivo призводить до Т-клітинної відповіді, направленої на клітини пухлин і відповіді антитіл господаря.

Комплементзалежна цитотоксичність.

Іншим способом знищення клітин, який може бути опосередкований антитілами, є CDC. Найефективнішим ізотипом для активації комплементу є IgM. Також дуже ефективними при спрямовуванні CDC через класичний шлях активації комплементу є IgG1 і IgG3. Бажано, утворення комплексів антиген-антитіло в цьому каскаді призводить до розкриття численних місць зв'язування C1q в безпосередній близькості на CH2 доменах задіяних молекул антитіл, наприклад, молекул IgG (C1q є одним з трьох субкомпонентів комплементу C1). Бажано ці розкриті місця зв'язування C1q перетворюють взаємодію C1q – IgG до цього з низькою спорідненістю на спорідненість з високою авидністю, яка запускає каскад подій, які залучають ряд інших білків комплементу, і призводить до протеолітичного вивільнення

хемотаксичних/активуючих агентів ефекторних клітин C3a і C5a. Бажано каскад комплементу закінчується утворенням мембрано-атакуючого комплексу, який створює пори в клітинній мембрані, які сприяють вільному проходженню води і розчинених речовин в клітини і з клітин.

Продуктування антитіл

Антитіла запропоновані винаходом можна отримати за допомогою ряду методів, включаючи звичайну методику отримання моноклональних антитіл, наприклад, методом гібридизації стандартних соматичних клітин Kohler і Milstein, Nature 256: 495 (1975). Не дивлячись на те, що методи гібридизації соматичних клітин є бажаними, в принципі можна використовувати інші методи отримання моноклональних антитіл, наприклад, шляхом вірусної або онкогенної трансформації В-лімфоцитів, або методом фагового дисплея з використанням бібліотек генів антитіл.

Бажаною тваринною системою для отримання гібридами, яка секретує моноклональні антитіла, є мишача система. Отримання гібридами в миші є загальноприйнятим методом. Протоколи імунізації і методики виділення імунізованих спленоцитів для злиття добре відомі в даній галузі техніки. Клітини (наприклад, мишачі клітини мієломи), які зливаються і процедури злиття також добре відомі.

Іншими кращими тваринними системами для отримання гібридом, які секретують моноклональні антитіла, є щури або кролики (наприклад, система, описана в Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), дивися також Rossi et al., Am. J. Clin. 35 Pathol. 124:295(2005)).

У іншому кращому варіанті здійснення людські моноклональні антитіла, спрямовані до CLDN6, можна отримати за допомогою трансгенних або трансхромосомних мишей, які несуть частини людської імунної системи, а не мишачої системи. Ці трансгенні або трансхромосомні миші включають мишей, відомих як миші HuMAb і миші KM, відповідно, і разом згадуються в описі як "трансгенні миші". Отримання людських антитіл в таких трансгенних мишах можна здійснити, як детально описано для CD20 в WO2004 035607

Іншою стратегією отримання моноклональних антитіл є пряме виділення генів, які кодують антитіла, з лімфоцитів, які продукують антитіла, наприклад, див. Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Подобиці розробки рекомбінантних антитіл дивися також в Welschof і Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 і Benny K.C. Lo Антитіло Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Імунізація

Для отримання антитіл до CLDN6, мишей можна імунізувати кон'югованими з носієм пептидами, отриманими з CLDN6-последовності, препаратом, збагаченим рекомбінантно експресованим CLDN6-антигеном або його фрагментами і/або клітинами, які експресують CLDN6 або його фрагменти, як описано. Альтернативно, мишей можна імунізувати ДНК, яка кодує людський повнорозмірний CLDN6 або його фрагменти. У тому випадку, коли імунізація з використанням очищеного або збагаченого препарату антигену CLDN6 не приводить до утворення антитіл, мишей також можна імунізувати клітинами, які експресують CLDN6, наприклад, клітинною лінією, щоб сприяти імунній відповіді.

Імунну відповідь можна контролювати впродовж виконання протоколу імунізації, відбираючи зразки плазми і сироватки з хвостової вени або ретроорбітально. Миші з достатнім титром анти-CLDN6 імуноглобуліну можуть використовуватися для злиття. Мишей можна піддати стимуляції внутрішньочеревно і внутрішньовенно клітинами, які експресують CLDN6, і за 3-5 днів до забою і видалення селезінки для того, щоб збільшити швидкість секретування специфічних антитіл гібридомами.

Отримання гібридом, які продукують моноклональні антитіла

Для отримання гібридом, які продукують моноклональні антитіла до CLDN6, з лімфатичних вузлів або селезінки, отриманих від імунізованих мишей, можуть бути виділені клітини і злиті з відповідною іморталізованою клітинною лінією, наприклад, лінією клітин мієломи миші. Потім можна відібрати отримані гібридами із продуктування антиген-специфічних антитіл. У такому випадку за допомогою методу ELISA можна відібрати окремі комірки з гібридомами, які секретують антитіла. За допомогою імунофлуоресценції і FACS-аналізу з використанням клітин, які експресують CLDN6, можна встановити антитіла із специфічністю до CLDN6. Гібридами, які секретують антитіла, можна знов висіяти, провести відбір і позитивні за анти-CLDN6 моноклональними антитілами можна субклонувати за допомогою серійного розведення. Потім стабільні субклони культивують in vitro в середовищі для культури тканини, щоб отримати і охарактеризувати антитіла.

Отримання трансфектом, які продукують моноклональні антитіла

Антитіла запропоновані винаходом також можна отримати в клітинах-господарях, таких як, трансфектоми, використовуючи, наприклад, комбінацію методів рекомбінантних ДНК і методів трансфекції генів, добре відомих в даній галузі техніки (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Наприклад, в одному варіанті здійснення гени(ген), які представляють інтерес, наприклад, гени антитіл, можуть лігувати у вектор експресії, такий як еукаріотична експресуюча плазміда, яка, наприклад, використовується системою експресії гена GS, розкритою в WO 87/04462, WO 89/01036 і EP 338 841, або інші системи експресії, добре відомі в даній галузі. Очищена плазміда з клонованими генами антитіла може бути введена в еукаріотичну клітину-господаря, таку як CHO клітини, NS/O клітини, HEK293T клітини або HEK293 клітини або альтернативно інші еукаріотичні клітини, подібні до клітин рослин, грибів або дріжджів. Методами, які використовуються для введення цих генів можуть бути методи, описані в даній галузі техніки, такі як електропорація, ліпофектин, ліпофектамін або інші. Після введення цих генів антитіл в клітини-господарі, клітини, які експресують антитіло можуть бути пізнані і відібрані. Ці клітини є трансфектомами, які потім можна ампліфікувати і масштабувати для продукування антитіл. Рекомбінантні антитіла можуть бути ізольовані і очищені з цих культуральних супернатантів і/або клітин.

Альтернативно, клоновані гени антитіла можуть бути експресованими в інші системи експресії, включаючи прокаріотичні клітини, такі як мікроорганізми, наприклад, E. coli. Більше того, антитіла можуть продукуватися в трансгенних організмах, які не є людиною, і бути присутніми, наприклад, в молоці овець і кроликів або в яйцях курей, або в трансгенних рослинах; дивися, наприклад, Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; і Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

Використання часткових послідовностей антитіл для експресії інтактних антитіл (тобто гуманізація і химеризація).

а) Химеризація

Мишачі моноклональні антитіла можуть використовуватися як терапевтичні антитіла для людей, у тому випадку, коли до них прикріплюється токсин, або коли їх мітять радіоактивними ізотопами. При повторному застосуванні немічені мишачі антитіла є високо імуногенними для людини, що приводить до зменшення терапевтичного ефекту. Основна імуногенність опосередкована константними областями важкого ланцюга. Імуногенність мишачих антитіл у людини можна зменшити або повністю її уникнути, якщо відповідні антитіла зробити химерними або гуманізованими. Химерні антитіла є антитілами, різні частини яких походять від різних видів тварин, наприклад, антитіла мають варіабельну область, отриману від мишачого антитіла і константну область людського імуноглобуліну. Химеризація антитіл досягається з'єднанням варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів мишачих антитіл з людською константною областю важкого і легкого ланцюга (наприклад, як описано Kraus et al., у Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8). У бажаному варіанті здійснення химерні антитіла отримують з'єднанням людської константної області каппа-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. У бажаному варіанті здійснення химерні антитіла отримують з'єднанням людської константної області лямбда-легкого ланцюга з мишачою варіабельною областю легкого ланцюга. Кращими константними областями важкого ланцюга для отримання химерних антитіл є IgG1, IgG3 і IgG4. Іншими кращими константними областями важкого ланцюга для отримання химерних антитіл є IgG2, IgA, IgD і IgM.

б) Гуманізація

Антитіла взаємодіють з цільовими антигенами бажано через амінокислотні залишки, розташовані в шести гіперваріабельних ділянках (CDR) важкого і легкого ланцюга. З цієї причини амінокислотні послідовності в CDR є більш різними між окремими антитілами, ніж послідовності зовні CDR. Оскільки CDR-послідовності відповідають за більшість взаємодій антитіло-антиген, є можливою експресія рекомбінантних антитіл, які наслідують властивостям специфічних природних антитіл, шляхом конструювання векторів експресії, які включають CDR-послідовності від специфічних природних антитіл, пересажені на каркасні послідовності від іншого антитіла з іншими властивостями (див., наприклад, Riechmann, L, et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522-525; і Queen, S. et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). Такі каркасні послідовності можна отримати з публічних баз даної ДНК, яка включає зародкові послідовності генів антитіл. Ці зародкові послідовності відрізнятимуться від зрілих послідовностей генів антитіл, оскільки вони не включають повністю зібрані мінливі гени, які формуються при V (D) J з'єднанні під час дозрівання В-клітини. Зародкові генні послідовності також відрізнятимуться від послідовностей високоафінного антитіла з вторинного репертуару окремою рівномірною варіабельною областю. Наприклад, соматичні мутації є

відносно рідкісними в амінокінцевій частині каркасної ділянки 1 і в карбоксикінцевій частині каркасної ділянки 4. Більше того, багато соматичних мутацій значно не змінюють зв'язуючі властивості антитіла. З цієї причини, необхідно отримати повну послідовність ДНК окремого антитіла, для того, щоб наново створити (відновити) інтактне рекомбінантне антитіло, яке має властивості, схожі з властивостями первинного антитіла (див. WO 99/45962). З цією метою, як правило, достатньо часткових послідовностей важкого і легкого ланцюга, які сполучають CDR ділянки. Часткова послідовність використовується, щоб визначити які зародкові варіабельні і сполучаючі генні сегменти сприяють рекомбінуванню мінливих генів антитіла. Потім використовується зародкова послідовність, щоб заповнити ті частини варіабельних ділянок, яких бракує. Лідерні послідовності важкого і легкого ланцюга розщеплюються під час дозрівання білка і не вносять внесок до властивостей антитіла. Щоб додати відсутні послідовності, клоновані кДНК-послідовності можна з'єднати з синтетичними олігонуклеотидами за допомогою лігування або ПЛР-ампліфікації. Альтернативно, повна варіабельна область може бути синтезована як набір коротких, олігонуклеотидів, які перекриваються, і об'єднана за допомогою ПЛР-ампліфікації, щоб створити клон з повністю синтетичною варіабельною областю. Цей процес має певні переваги, такі як елімінація, або включення, або окремі сайти рестрикції, або оптимізація окремих кодонів.

Нуклеотидні послідовності транскриптів важкого і легкого ланцюга з гібридом використовуються для складання перекриваючого набору синтетичних олігонуклеотидів, щоб створити синтетичні V-послідовності з можливістю кодування тих же самих амінокислот, як в природній послідовності. Послідовності синтетичного важкого і каппа-ланцюга можуть відрізнятися від природних послідовностей в трьох варіантах: нитки повторних нуклеїнових основ перериваються, щоб полегшити синтез олігонуклеотидів і ПЛР ампліфікацію; оптимальні сайти ініціації трансляції включаються згідно правилам Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); і сайти HindIII створюються вище від сайтів ініціації трансляції.

Що стосується варіабельних областей і важкого і легкого ланцюгів, оптимізовані кодуєчі і відповідні некодуєчі ділянки послідовностей розділяються на 30-50 нуклеотидів приблизно в серединній точці відповідного некодуєчого олігонуклеотиду. Таким чином, для кожного ланцюга олігонуклеотиди можуть бути зібрані в двониткові набори, які перекриваються, які охоплюють сегменти із 150-400 нуклеотидів. Ці пули (клястери, групи) потім використовуються як матриці для отримання продуктів ПЛР-ампліфікації з 150-400 нуклеотидів. Як правило, одна варіабельна область олігонуклеотидного набору розділятиметься на два пули, які окремо ампліфікуються, щоб виробити два ПЛР-продукта, що перекриваються. Потім ці продукти, що перекриваються, потім об'єднують за допомогою ПЛР-ампліфікації, щоб створити повну варіабельну область. Також може бути бажане включення фрагмента варіабельної області важкого або легкого ланцюга, що перекривається, в ПЛР-ампліфікацію для створення фрагментів, які можна легко клонувати в конструкти векторів експресії.

Потім реконструйовані химерну і гуманізовану варіабельні області важкого і легкого ланцюга об'єднують з клонованими послідовностями промоторної ділянки, лідерної ділянки, ділянки ініціації трансляції, константної області, 3' нетрансльованих ділянки, ділянка поліаденілювання і ділянки термінації транскрипції, щоб утворити конструкти вектора експресії. Конструкти експресії важкого і легкого ланцюга можуть бути об'єднані в один вектор, ко-трансфіковані, послідовно трансфіковані або окремо трансфіковані в клітини-господарі, які потім зливаються з утворенням клітини-господаря, яка експресує обидва ланцюги. Описані плазмідні, які використовуються в створенні векторів експресії для людського IgGκ. Плазмідні можуть бути створені так, що ПЛР-ампліфіковані кДНК-послідовності V важкого і V каппа легкого ланцюга можуть використовуватися для реконструювання мінігенів повного важкого і легкого ланцюга. Ці плазмідні можуть використовуватися для експресії повністю людського або химерного IgG1, каппа або IgG4, каппа антитіл. Можуть бути створені подібні плазмідні для експресії інших ізотипів важкого ланцюга або для експресії антитіл, що містять лямбда-легкі ланцюги.

Таким чином, в іншому аспекті винаходу структурні ознаки анти-CLDN6 антитіл запропонованих даним винаходом використовуються для створення структурно-споріднених гуманізованих анти-CLDN6 антитіл, які зберігають, щонайменше, одну функціональну властивість антитіл запропонованих даним винаходом, наприклад, зв'язування з CLDN6. Конкретніше, одна або більше CDR-ділянок мишачого моноклонального антитіла може бути рекомбінантно об'єднана з відомими людськими каркасними ділянками і CDR для створення додаткових рекомбінантно-сконструйованих гуманізованих анти-CLDN6 антитіл запропонованих даним винаходом.

Зв'язування з клітинами, які експресують антиген

Здатність антитіла зв'язуватися з CLDN6 можна визначити за допомогою стандартних

методів аналізу, таких як, методи, представлені в прикладах (наприклад, ELISA, Вестерн-блотінг, імуофлуоресценція і проточна цитометрія).

Ізолювання і характеристика антитіл

З метою очищення моноклональних анти-CLDN6 антитіл відібрані гібридами вирощують в дволітровій ролерній колбі. Альтернативно анти-CLDN6 антитіла можна отримати в біореакторі на основі діалізу. За необхідності супернатанти можна профільтрувати, концентрувати перед проведенням афінної хроматографії з протеїн-G-сефарозою або протеїн-A-сефарозою. Чистоту елюйованого IgG можна проконтролювати за допомогою гель-електрофорезу і вискозної рідинної хроматографії. Буферний розчин можна поміняти на PBS, а концентрацію можна визначити при OD280 з використанням коефіцієнта екстинції 1,43. Моноклональні антитіла можна розділити на аліквоти і зберігати при -80 °C.

Для того, щоб визначити, чи зв'язуються відібрані анти-CLDN6 моноклональні антитіла з єдиним епітопом, може бути застосований сайт-направлений або мульти-сайт-направлений мутагенез.

Встановлення ізо типу

Для встановлення ізо типу очищених антитіл проводили аналіз ELISA з різними комерційними наборами (наприклад, Zymed, Roche Diagnostics). Комірочки титраційних мікропланшетів покривають анти-мишиним Ig. Після блокування проводили реакцію з моноклональними антитілами або очищеними ізо типними контролюми за кімнатної температури протягом двох годин. Потім проводили реакцію або з мишачим IgG1, IgG2a, IgG2b або IgG3, IgA або із специфічним мишачим IgM, кон'югованим з пероксидазою. Після промивання планшети обробляють ABTS субстратом (1 міліграм/мл) і досліджують при OD 405-650. Альтернативно, можна використовувати набір для ізо типування IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027), як описано виробником.

Проточний цитометричний аналіз

Для того, щоб продемонструвати наявність анти-CLDN6 антитіл в сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують CLDN6, можна використовувати проточну цитометрію. Лінії клітин, які експресують CLDN6 в нормі або після трансфекції, і негативні контролю, які втратили експресію CLDN6 (вирощені за стандартних умов), змішують з різними концентраціями моноклональних антитіл в супернатантах від гібридом або в PBS, що містить 1 % FBS, та інкубують при 4 °C протягом 30 хв. Після промивання мічені APC або Alexa647 анти-IgG антитіла можуть зв'язуватися з CLDN6-связаними моноклональними антитілами за таких же умов, як умови для фарбування первинних антитіл. Зразки можна проаналізувати за допомогою проточної цитометрії на приладі FACS, використовуючи параметри прямого і бічного розсіювання світла, щоб пропускати окремі живі клітини. Для того, щоб відрізнити CLDN6-специфічні моноклональні антитіла від неспецифічних зв'язуючих речовин в одному вимірюванні, можна використовувати метод контрастності. Клітини тимчасово трансфіковані плазмідами, які кодують CLDN6 і флуоресцентним маркером, можна пофарбувати, як описано вище. Трансфіковані клітини можна встановити в іншому діапазоні флуоресценції, ніж антитіло-зафарбовані клітини. Оскільки більшість трансфікованих клітин експресують обидва трансгени, CLDN6-специфічні моноклональні антитіла зв'язуються переважно з клітинами, які експресують флуоресцентний маркер, тоді як неспецифічні антитіла зв'язуються в співрозмірному співвідношенні з нетрансфікованими клітинами. Можна застосовувати альтернативний метод аналізу з використанням флуоресцентної мікроскопії на додачу до або замість проточної цитометрії. Клітини можна пофарбувати так, як описано вище, і досліджувати за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Імуофлуоресцентна мікроскопія

Для того, щоб продемонструвати наявність анти-CLDN6 антитіл в сироватці імунізованих мишей або зв'язування моноклональних антитіл з живими клітинами, які експресують CLDN6, можна використовувати імуофлуоресцентну мікроскопію. Наприклад, клітинні лінії, які експресують CLDN6 або спонтанно або після трансфекції, і негативні контролю, які втратили експресію CLDN6, вирощують на предметних скельцях за стандартних умов вирощування в середовищі DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FCS), 2 mM L-глутаміну, 100 мкг/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Потім клітини фіксують метанолом або параформальдегідом або залишають необробленими. Потім проводять реакцію клітин з моноклональними антитілами до CLDN6 протягом 30 хвилин при 25 °C. Після промивання проводять реакцію клітин з міченими Alexa555 анти-мишачими IgG вторинними антитілами (Molecular Probes) за тих же самих умов. Після цього можна досліджувати клітини за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Загальні рівні CLDN6 в клітинах можна спостерігати, коли клітини зафіксовані метанолом або зафіксовані параформальдегідом і пермеабілізовані Тритоном X-100. В живих клітинах і непермеабілізованих, фіксованих параформальдегідом клітинах можна досліджувати поверхневу локалізацію CLDN6. Крім того, націлювання CLDN6 на щільні контакти можна вивчати за допомогою спільного фарбування з маркерами щільних контактів, наприклад, ZO-1. Більше того, можна вивчати результати зв'язування антитіл і локалізацію CLDN6 в клітинній мембрані.

Вестерн-блотінг

Анти-CLDN6 IgG можна додатково протестувати на реакційну здатність з CLDN6 антигеном за допомогою Вестерн-блотінга. Коротко, можна приготувати клітинні екстракти клітин, які експресують CLDN6, і відповідні негативні контролю і провести електрофорез в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфата натрію (SDS). Після електрофорезу відокремлені антигени переносять на мембрани нітроцелюлози, блокують і досліджують за допомогою тестованих моноклональних антитіл. IgG-зв'язування можна визначити за допомогою анти-мишачого IgG міченого пероксидазою і виявити за допомогою ECL субстрату.

Імуногістохімія

Анти-CLDN6 мишачі IgG можна додатково протестувати на реакційну здатність з CLDN6 антигеном за допомогою імуногістохімічного аналізу добре відомим фахівцеві в даній галузі способом, наприклад, з використанням кріо-зрізів, фіксованих параформальдегідом або ацетоном, або фіксованих параформальдегідом парафінових зрізів зразків неракових тканин або ракових тканин, узятих у пацієнта під час звичайних хірургічних процедур, або у мишей з ксенотрансплантатів пухлин, інкульованих за допомогою ліній клітин, які експресують CLDN6 спонтанно або після трансфекції. Для імунофарбування антитіла, які реагують з CLDN6, можуть бути проінкубовані, а потім кон'юговані з міченими пероксидазою хрину козячими анти-мишачими або козячими анти-кроликовими антитілами (DAKO) згідно інструкціям продавця.

Активність антитіл *in vitro*, пов'язана з фагоцитозом і здатністю знищувати клітини

На додачу до специфічності зв'язування з CLDN6, анти-CLDN6 антитіла можна перевірити щодо їх спроможності опосередковувати фагоцитоз і знищення клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Перевірка активності моноклональних антитіл *in vitro* забезпечує первинний скринінг до тестування на моделях *in vivo*.

Антитілозалежна клітинна цитотоксичність (ADCC):

Коротко, поліморфоядерні клітини (PMN), NK-клітини, моноцити, мононуклеарні клітини або інші ефекторні клітини від здорових донорів можна очистити центрифугуванням в градієнті щільності фікол-гіпака, з подальшим руйнуванням забруднюючих еритроцитів. Промиті ефекторні клітини суспендують в RPMI з додаванням 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки або альтернативно з 5 % інактивованої нагріванням людської сироватки і змішують з ^{51}Cr -міченими клітинами-мішенями, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, в різних співвідношеннях ефекторних клітин до клітин-мішеней. Альтернативно, клітини-мішені можна помітити лігандом, який підсилює флуоресценцію (BATDA). Високо флуоресцентний хелат європію з підсилюючим лігандом, який вивільняється з мертвих клітин, можна визначити за допомогою флуориметра. У іншому альтернативному способі може використовуватися трансфекція клітин-мішеней люциферазою. При цьому доданий люцифер жовтий може окислюватися тільки живими клітинами. Потім можна додати очищені анти-CLDN6 IgG в різних концентраціях. Як негативний контроль можна використовувати нерелевантний людський IgG. Дослідження проводиться протягом від 4 до 20 годин при 37 °C залежно від типу використовуваних ефекторних клітин. Цитоліз в зразках можна оцінити шляхом вимірювання вивільнення ^{51}Cr або наявності хелату EUTDA в культуральному супернатанті. Альтернативно, можна виміряти люмінесценцію живих клітин, що є результатом окислення люцифера жовтого.

Також можна перевірити різні комбінації анти-CLDN6 моноклональних антитіл, щоб визначити чи посилюється цитоліз при дії складів моноклональних антитіл.

Комплементзалежна цитотоксичність (CDC):

Моноклональні анти-CLDN6 антитіла можна перевірити щодо їх здатності опосередковувати CDC за допомогою ряду відомих методів. Наприклад, сироватку для отримання комплексу можна отримати з крові відомим фахівцям способом. Для визначення CDC-активності моноклональних антитіл можна використовувати різні методи. Наприклад, можна визначити вивільнення ^{51}Cr або можна оцінити підвищену проникність мембран за допомогою методу виключення пропідіум йодидом (PI). Коротко, цільові клітини промивають $5 \times 10^5/\text{мл}$ і інкубують з різними концентраціями mAb протягом 10-30 хвилин за кімнатної температури або при 37 °C.

Потім додають сироватку або плазму до остаточної концентрації 20 % (об./об.) і клітини інкубують при 37 °C протягом 20-30 хвилин. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI в пробірку для FACS-аналізу. Після цього суміш негайно аналізують за допомогою проточної цитометрії, використовуючи FACS-набір.

У альтернативному способі дослідження індукцію CDC можна встановити на прикріплених клітинах. У одному варіанті здійснення цього методу аналізу клітини висівають за 24 години до дослідження з щільністю 3×10^4 /комірку в плоскодонні титраційні мікропланшети для культур тканин. Наступного дня культуральне середовище видаляють і клітини інкубують з антитілами (три повтори). Контрольні клітини інкубують в культуральному середовищі або культуральному середовищі, яке містить 0,2 % сапоніну для визначення фонового лізису і максимального лізису, відповідно. Після інкубації протягом 20 хвилин за кімнатної температури супернатант видаляють і додають до клітин 20 % (об./об.) людської плазми або сироватки в DMEM (заздалегідь нагрітої до 37 °C) і інкубують протягом наступних 20 хвилин при 37 °C. До клітин додають розчин пропідій йодиду (10 мкг/мл). Потім супернатанти заміняють PBS, що містить 2,5 мкг/мл етидіум броміду і вимірюють випускання флуоресценції після збудження при 520 нм при 600 нм за допомогою Tecan Satire. Відсоток специфічного лізису обчислюють як вказано далі:

$$\% \text{ специфічного лізису} = (\text{флуоресценція зразка} - \text{фонова флуоресценція}) / (\text{флуоресценція за максимального лізису} - \text{фонова флуоресценція}) \times 100.$$

Інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами:

Наприклад, щоб перевірити здатність моноклональних анти-CLDN6 антитіл ініціювати апоптоз, їх інкубують з пухлинними клітинами, позитивними за CLDN6, або CLDN6-трансфікованими пухлинними клітинами при 37 °C протягом приблизно 20 годин. Клітини збирають, промивають в анексин-V зв'язуючому буфері (BD biosciences), та інкубують з анексином V, сполученим з FITC або APC (BD biosciences) протягом 15 хвилин в темноті. До всіх клітин кожного зразка додають розчин PI (10 мкг/мл в PBS) в пробірку для FACS-аналізу і відразу оцінюють за допомогою проточної цитометрії (як описано вище). Альтернативно, загальне інгібування клітинної проліферації моноклональними антитілами можна визначити за допомогою комерційно доступних наборів. За допомогою набору для визначення клітинної проліферації DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) можна провести неізотопний імуноаналіз в мікропланшетах, заснований на вимірюванні включення 5-бром-2'-дезоксиридину (BRDU) під час синтезу ДНК проліферуючими клітинами. Включені BRDU визначають за допомогою мічених європієм моноклональних антитіл. Щоб зробити можливим виявлення антитіл, клітини фіксують і проводять денатурацію ДНК, використовуючи Fix (фіксуючий) розчин. Незв'язані антитіла змивають і додають в розчин індуктор DELFIA, щоб відокремити іони європію від мічених антитіл, де вони утворюють високо флуоресцентні хелати з компонентами індуктора DELFIA. Флуоресценція, виміряна в кожній комірці за допомогою флуориметрії з часовим розрізненням є пропорційною до синтезу ДНК в клітині.

Доклінічні дослідження

Моноклональні антитіла, які зв'язуються з CLDN6, також можуть бути перевірені на моделі *in vivo* (наприклад, на імунодефіцитних мишах з ксенотрансплантатом пухлин, інокульованих клітинними лініями, які експресують CLDN6, можливо після трансфекції) для встановлення їх ефективності при контролі зростання клітин пухлин, які експресують CLDN6.

Дослідження антитіл запропонованих даним винаходом *in vivo* можна провести після ксенотрансплантації пухлинних клітин, які експресують CLDN6, імунодефіцитним мишам або іншим тваринам. Щоб визначити дію антитіл на запобігання утворенню пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлиною, антитіла можна ввести мишам, вільним від пухлини, з подальшою ін'єкцією пухлинних клітин. Щоб встановити терапевтичну ефективність відповідних антитіл відносно зменшення росту пухлин або симптомів, пов'язаних з пухлиною, антитіла можна ввести мишам – носіям пухлин. Застосування антитіл можна комбінувати із застосуванням інших речовин, таких як цитостатичні засоби, інгібітори чинників зростання, блокатори клітинного циклу, інгібітори ангиогенезу або іншими антитілами, щоб визначити синергічну ефективність і потенційну токсичність комбінацій. Щоб проаналізувати токсичні побічні явища, опосередковані антитілами запропонованими винаходом, тварині можна інокульовати антитіла або контрольні реагенти і ретельно вивчити симптоми, можливо пов'язані з терапією антитілами до CLDN6. Зокрема, можливі побічні явища від застосування *in vivo* CLDN6-антитіл включають токсичний вплив на тканини, які експресують CLDN6, включаючи плаценту. Антитіла, які розпізнають CLDN6 у людини і у інших видів, наприклад, мишей, є, зокрема, придатними для прогнозу можливих побічних явищ, опосередкованих застосуванням моноклональних CLDN6-антитіл, у людей.

Картування епітопів

Картування епітопів, які розпізнаються антитілами запропонованими винаходом, можна провести, як детально описано в "Epitope Mapping Protocols" (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 і в "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

5 І. Біспецифічні/мультиспецифічні молекули, які зв'язуються з CLDN6

У іншому варіанті здійснення винаходу антитіла до CLDN6 можуть утворювати похідне або можуть з'єднуватися з іншою функціональною молекулою, наприклад, іншим пептидом або білком (наприклад, Fab1 фрагментом), щоб утворити біспецифічну або мультиспецифічну молекулу, яка зв'язується з різними сайтами зв'язування або цільовими епітопами. Наприклад, антитіло запропоноване винаходом може бути функціонально зв'язане (наприклад, шляхом хімічного зв'язку, генетичного об'єднання (злиття), нековалентного зв'язку або іншим чином) з однією або більше іншими зв'язуючими молекулами, такими як інше антитіло, пептид або зв'язуючий міметик.

Відповідно, даний винахід включає біспецифічні і мультиспецифічні молекули, які містять, щонайменше, одну першу специфічність зв'язування для CLDN6 і другу специфічність зв'язування для другого цільового епітопу. У окремому варіанті здійснення винаходу другий цільовий епітоп є Fc-рецептором, наприклад, людським Fc-гаммаRI (CD64) або людським Fc-альфа рецептором (CD89) або Т-клітинним рецептором, наприклад, CD3. Отже, винахід включає біспецифічні і мультиспецифічні молекули, здатні зв'язуватися з ефекторними клітинами, які експресують Fc-гаммаR, Fc-альфаR або Fc-епсилонR (наприклад, моноцитами, макрофагами або поліморфоядерними клітинами (PMN)) і з клітинами-мішенями, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Ці біспецифічні і мультиспецифічні молекули можуть націлювати ефекторні клітини на клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, і можуть ініціювати активність ефекторних клітин, опосередковану Fc-рецептором, наприклад, фагоцитоз клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC), вивільнення цитокінів або продукування супероксид-аніону.

Біспецифічні і мультиспецифічні молекули винаходу можуть додатково включати третю специфічність зв'язування, на додачу до анти-Fc-специфічності зв'язування і анти-CLDN6-специфічності зв'язування. У одному варіанті здійснення третя специфічність зв'язування є частиною анти-стимулюючого чинника (EF), наприклад, молекулою, яка зв'язується з поверхнею білка, задіяного в цитотоксичній активності і таким чином збільшує імунну відповідь проти клітини-мішені. "Частина анти-стимулюючого чинника" може бути антитілом, функціональним фрагментом антитіла або лігандом, який зв'язується з даною молекулою, наприклад, антиген або рецептор, і таким чином призводить до посилення ефекту зв'язування детермінант для Fc-рецептора або антигену клітини-мішені. "Частина анти-стимулюючого чинника" може зв'язувати Fc-рецептор або антиген клітини-мішені. Альтернативно, частина анти-стимулюючого чинника може зв'язуватися з частинкою (entity), яка відрізняється від частинки, з якою зв'язуються перша і друга специфічності зв'язування. Наприклад, частина анти-стимулюючого чинника може зв'язуватися з цитотоксичною Т-клітиною (наприклад, через CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 або іншою імунною клітиною, що призводить до підвищення імунної відповіді проти клітини-мішені).

У одному варіанті здійснення біспецифічні і мультиспецифічні молекули винаходу містять як специфічність зв'язування, щонайменше, одне антитіло, включаючи, наприклад, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv або один ланцюг Fv. Антитіло також може бути димером легкого ланцюга або важкого ланцюга, або будь-яким мінімальним його фрагментом, таким як Fv або одноланцюговий конструкт, як описано в Ladner et al., US 4,946,778. Антитіло також може бути доменом зв'язування химерного білка імуноглобуліну, як розкрито в US 2003/0118592 і US 2003/0133939.

У одному варіанті здійснення біспецифічні і мультиспецифічні молекули винаходу містять специфічність зв'язування для Fc-гаммаR або Fc-альфаR, присутніх на поверхні ефекторної клітини, і другу специфічність зв'язування для антигену клітини-мішені, наприклад, CLDN6.

У одному варіанті здійснення специфічність зв'язування для Fc-рецептора забезпечується моноклональним антитілом, зв'язування якого не блокується людським імуноглобуліном G (IgG). Термін "IgG рецептор", як він використовується в описі, відноситься до будь-якого з восьми генів гамма-ланцюга, розташованих на хромосомі 1. Ці гени кодують всі дванадцять трансмембранних або розчинних ізоформ рецептора, які розділені на три класи Fc-гамма рецепторів: Fc-гаммаRI (CD64), Fc-гаммаRII (CD32) і Fc-гаммаRIII (CD16). У одному з кращих варіантів здійснення Fc-гамма рецептор є людським високоафінним Fc-гаммаRI.

У інших кращих варіантах здійснення специфічність зв'язування для Fc-рецептора забезпечується антитілом, яке зв'язується з людським IgA-рецептором, наприклад, Fc-альфа рецептором (Fc-альфаR1 (CD89)), зв'язування якого бажано не блокується людським імуноглобуліном A (IgA). Термін "IgA рецептор" включає генний продукт одного альфа-гена (Fc-альфаRI), розташованого на хромосомі 19. Відомо, що цей ген кодує декілька альтернативних трансмембранних сплайс-ізоформ від 55 до 110 Kda. Fc-альфаRI (CD89) конститутивно експресується на моноцитах/макрофагах, еозинофільних і нейтрофільних гранулоцитах, але не експресується на популяціях неефекторних клітин. Fc-альфаRI має середню афінність і до IgA1 і до IgA2, яка збільшується після дії цитокінів, таких як G-CSF або GM-CSF (Morton, H. C. et al. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16: 423-440). Було описано чотири Fc-альфаRI-специфічних моноклональні антитіла, які були названі A3, A59, A62 і A77, які зв'язують Fc-альфаRI зовні IgA ліганд-зв'язуючого домену (Monteiro, R. C. et al. (1992) *J.Immunol.* 148: 1764).

У іншому варіанті здійснення біспецифічна молекула складається з двох моноклональних антитіл згідно винаходу, які мають комплементарні функціональні активності, наприклад, одне антитіло бажано індукуює CDC, а інше антитіло бажано індукуює апоптоз.

Термін "антитіло, специфічне до ефекторної клітини", як він використовується в описі, відноситься до антитіла або функціонального фрагмента антитіла, який зв'язується з Fc-рецептором ефекторних клітин. Кращі антитіла для застосування у винаході зв'язуються з Fc-рецептором ефекторних клітин в сайті, який не зв'язується ендегенним імуноглобуліном.

Термін "ефекторна клітина", як він використовується в описі, відноситься до імунної клітини, яка залучається у ефекторну фазу імунної відповіді, на відміну від фази розпізнавання і фази активації імунної відповіді. Приклади імунних клітин включають клітини мієлоїдного і лімфоїдного походження, наприклад, лімфоцити (наприклад, В-клітини і Т-клітини, включаючи цитолітичні Т-клітини (CTL), клітини-кілери, клітини природні (натуральні) кілери, макрофаги, моноцити, еозинофіли, нейтрофіли, поліморфоядерні клітини, мастоцити і базофіли. Деякі ефекторні клітини експресують специфічні Fc-рецептори і виконують специфічні імунні функції. У кращих варіантах здійснення ефекторна клітина здатна індукувати антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC), наприклад, нейтрофіл, здатний індукувати ADCC. Наприклад, моноцити, макрофаги, які експресують FCR, беруть участь в специфічному знищенні клітин-мішеней і презентуванні антигенів іншим компонентам імунної системи або зв'язуються з клітинами, які презентують антигени. У інших варіантах здійснення ефекторна клітина може фагоцитувати антиген-мішень, клітину-мішень або мікроорганізм. Експресія конкретного FCR на ефекторній клітині може регулюватися гуморальними чинниками, такими як цитокіни. Наприклад, було виявлено, що експресія Fc-гаммаRI регулюється з підвищенням інтерфероном гамма (IFN- γ). Ця посилена експресія збільшує цитотоксичну активність Fc-гаммаRI-несучих клітин проти мішеней. Ефекторна клітина може фагоцитувати або лізувати антиген-мішень або клітину-мішень.

"Клітина-мішень" позначає будь-яку небажану клітину у суб'єкта (наприклад, людини або тварини), на яку може націлюватися антитіло запропоноване винаходом. У кращих варіантах здійснення клітина-мішень є клітиною, яка експресує або яка гіперекспресує CLDN6 і яка характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, як правило, включають пухлинні клітини.

II. Імунокон'югати

У іншому аспекті даний винахід визначає властивість анти-CLDN6 антитіла, кон'югованого з терапевтичною частинкою або засобом, таким як цитотоксин, лікарський засіб (наприклад, імуносупресор) або радіоізотоп. Такі кон'югати називаються в описі "імунокон'югати". Імунокон'югати, які включають один або більше цитотоксинів, називаються "імунотоксини". Цитотоксин або цитотоксичний засіб є будь-яким засобом, який має негативний вплив на клітини, зокрема, убиває клітини. Приклади включають таксол, цитохалазин В, грамїцидин D, етидіум бромід, еметин, мітоміцин, етопозид, теніпозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, доксорубіцин, даунорубіцин, дигідроксиантрациндіон, мітоксантрон, мітраміцин, актиноміцин D, 1-дегідротестостерон, глюкокортикоїди, прокаїн, тетракаїн, лідокаїн, пропранолол, пуроміцин та їх аналоги або гомологи.

Відповідні терапевтичні засоби для утворення імунокон'югатів винаходу включають, але не обмежуються цим, антиметаболіти (наприклад, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тіогуанін, цитарабін, флударабін, 5-фторурацил, декарбазин), алкілюючі засоби (наприклад, хлорметин, тіотеп, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) і ломустин (CCNU), циклофосфамід, бусульфат, дибромманітол, стрептозотозин, мітоміцин С і цис-дихлордиамінплатина (II) (DDP) цисплатин), антрациклінові антибіотики (наприклад, даунорубіцин (раніше дауноміцин) і

доксорубіцин), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (раніше актиноміцин), блеоміцин, мітраміцин і антраміцин (АМС), і антимітотичні засоби (наприклад, вінкрисін і вінбластин). У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є цитотоксичним засобом або радіотоксичним засобом. У іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є імуносупресором. У іншому варіанті здійснення терапевтичний засіб є GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальним колонієстимулюючим чинником). У кращому варіанті здійснення терапевтичний засіб є доксорубіцином, цисплатином, блеоміцином, сульфатом (sulfate), кармустином, хлорамбуцилом, циклофосфамідом або рициною А.

Антитіла запропоновані даним винаходом також можна з'єднати з радіоізотопом, наприклад, йодом-131, ітрієм-90 або індієм-111, щоб отримати цитотоксичні радіофармацевтичні кошти для лікування порушення, пов'язаного з CLDN6, такого як рак. Кон'югати антитіл запропонованих даним винаходом можна використовувати для того, щоб модифікувати дану біологічну відповідь, при цьому лікарська частинка не повинна розглядатися як така, що обмежує класичні хімічні терапевтичні лікарські засоби. Наприклад, лікарська частинка може бути білком або поліпептидом, який проявляє бажану біологічну активність. Такий білок може включати, наприклад, ферментативний активний токсин, або його активний фрагмент, такий як абрин, рицину А, екзотоксин синегнійної палички або дифтерійний токсин; білок, такий як чинник некрозу пухлини або інтерферон-γ; або модифікатори біологічної відповіді такі як, наприклад, лімфокіни, інтерлейкін-1 ("IL-1"), інтерлейкін-2 ("IL-2"), інтерлейкін-6 ("IL-6"), гранулоцитарно-моноцитарний колонієстимулюючий чинник ("GM-CSF"), гранулоцитарний колонієстимулюючий чинник ("G-CSF") або інші чинники росту.

Методи кон'югування (з'єднання) такої терапевтичної частинки з антитілом добре відомі, див., наприклад, Arnon et al, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) і Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

У додатковому варіанті здійснення антитіла запропоновані винаходом приєднується до лінкера-хелатора, наприклад, тіуксетану, який дозволяє антитілу кон'югувати з радіоізотопом.

III. Фармацевтичні композиції

У іншому аспекті даний винахід пропонує композицію, наприклад, фармацевтичну композицію, яка містить одне або комбінацію антитіл даного винаходу. Фармацевтичні композиції можуть бути введені в склад з фармацевтично прийнятними носіями або розчинниками, а також будь-якими іншими добре відомими ад'ювантами (допоміжними засобами) і ексципієнтами відповідно до звичайних методів, розкритих в Remington: The Science і Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. У одному варіанті здійснення композиції включають комбінацію декількох (наприклад, двох або більше) ізольованих антитіл запропонованих даним винаходом, які діють за допомогою різних механізмів дії, наприклад, одне антитіло, яке бажано діє викликаючи CDC, в комбінації з іншим антитілом, яке бажано діє викликаючи апоптоз.

Крім того, фармацевтичні композиції винаходу можуть вводитися при комбінованій терапії, тобто, у поєднанні з іншими засобами. Наприклад, комбінована терапія може включати композицію даного винаходу, щонайменше, з одним протизапальним засобом або, щонайменше, з одним імуносупресорним засобом. У одному варіанті здійснення такі терапевтичні засоби включають одне або більше протизапальних засобів, таких як стероїдний лікарський засіб або NSAID (нестероїдний протизапальний лікарський засіб). Кращі засоби включають, наприклад, аспірин і інші саліцилати, інгібітори Cox-2, такі як рофекоксиб (віокс) і целекоксиб (целебрекс), NSAID, такі як ібупрофен (мотрин, адвіл), фенопрофен (налфон), напроксен (напросин), суліндак (клінорил), диклофенак (вольтарен), піроксикам (фелден), кетопрофен (орудис), дифлунізал (долобід), набуметон (релафен), етодолак (лодин), оксапрозин (дейпро) та індометацин (індоцин).

У іншому варіанті здійснення такі терапевтичні засоби включають засоби, які призводять до виснаження або функціональної інактивації регуляторних Т-клітин, такі як циклофосфамід в низькій дозі, анти-CTLA4 антитіла, анти-IL2 або анти-IL2-рецепторні антитіла.

У іншому варіанті здійснення такі терапевтичні засоби включають один або більше засобів

хіміотерапії, таких як похідні таксолу, таксотер, гемцитабін, 5-фторурацил, доксорубіцин (адриаміцин), цисплатин (платінол), циклофосфамід (цитоксан, процитокс, неосар). У іншому варіанті здійснення антитіла запропоновані даним винаходом можуть вводитися в комбінації із засобами хіміотерапії, що бажано демонструють терапевтичну ефективність у пацієнтів, які страждають на рак, наприклад, описаний тут тип раку.

У іншому варіанті здійснення антитіла запропоновані винаходом можуть вводитися у поєднанні з радіотерапією і/або аутологічною периферійною стовловою клітиною або трансплантацією кісткового мозку.

Термін "фармацевтично прийнятний носій", як він використовується в описі, включає всі і будь-які розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні засоби і засоби, які затримують всмоктування, і тому подібне, які є фізіологічно сумісними. Бажано носій є придатним для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного, парентерального, спінального або епідермального введення (наприклад, за допомогою ін'єкції або вливання). Залежно від способу введення активна сполука, наприклад, антитіло, біспецифічна і мультиспецифічна молекула, може бути покрита речовиною, яка захищає сполуку від дії кислот та інших природних умов, які можуть інактивувати сполуку.

"Фармацевтично прийнятна сіль" відноситься до солі, яка зберігає бажану біологічну активність початкової сполуки і яка не має якого-небудь небажаного токсичного впливу (див. наприклад, Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

Приклади таких солей включають солі приєднання кислоти і солі приєднання основи. Солі приєднання кислоти включають солі, отримані з нетоксичних неорганічних кислот, таких як соляна кислота, азотна кислота, фосфорна, сірчана, бромисто-воднева кислота, йодистоводнева кислота, фосфориста і тому подібні, а також з нетоксичних органічних кислот, таких як аліфатичні моно- і дикарбонові кислоти, феніл-заміщені алканові кислоти, гідрокси-алканові кислоти, ароматичні кислоти, аліфатичні і ароматичні сульфонові кислоти і тому подібні. Солі приєднання основи включають солі отримані з лужноземельних металів, таких як натрій, калій, магній, кальцій тощо, а також з нетоксичних органічних амінів, таких як N, N'-дибензилетилендіамін, N-метилглюкамін, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, етилендіамін, прокаїн тощо.

Композиція даного винаходу може бути введена за допомогою цілого ряду способів, відомих в даній галузі техніки. Фахівцеві в даній області зрозуміло, що шлях і/або спосіб введення варіюватиме залежно від бажаних результатів. Активні сполуки можна приготувати разом з носіями, які захищатимуть сполуки від швидкого вивільнення, наприклад, у вигляді композицій з контрольованим вивільненням, включаючи імплантати, трансдермальні пластирі і мікроінкапсульовані системи доставки. Можна використовувати біодеградовані, біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколієва кислота, колаген, поліортоефіри і полімолочна кислота. Як правило, способи приготування таких композицій відомі фахівцям в даній галузі техніки. Див., наприклад, Sustained і Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Для введення сполуки запропонованої винаходом певними способами може бути потрібним покрити сполуки речовиною, або спільно ввести сполуку з речовиною, яка запобігає її інактивації. Наприклад, сполуки можна ввести суб'єктові у відповідному носіїві, наприклад, ліпосомах, або розчиннику. Фармацевтично прийнятні розчинники включають сольові і водні буферні розчини. Ліпосоми включають CGF емульсії вода-в-олії-у-воді, а також звичайні ліпосоми (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для екстемпорального приготування стерильних розчинів для ін'єкції, або дисперсій. Використання таких середовищ і компонентів для фармацевтично активних речовин відоме в даній галузі техніки. За винятком випадків, коли будь-яке звичайне середовище або засіб є несумісним з активною сполукою, розглядається їх використання у фармацевтичних композиціях винаходу. Крім того, до композиції можуть бути включені додаткові активні сполуки.

Як правило, терапевтичні композиції повинні бути стерильними і стійкими за умов виробництва і зберігання. Композиції можуть бути складені у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосоми або іншої упорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Носій може бути розчинником або дисперсійним середовищем, яке містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь і тому подібне) та їх відповідні суміші. Належну текучість можна зберегти, наприклад, використовуючи покриття, таке як лецитин, зберігаючи бажаний розмір часточок у випадку дисперсії і використовуючи поверхнево-активні речовини. У багатьох випадках бажаним є включення до

композиції ізотонічних засобів, таких як, цукор, поліспирти, такі як манітол, сорбітол або хлорид натрію. Тривале всмоктування композицій для ін'єкцій, може досягатися включенням до композиції засобу, який затримує всмоктування, наприклад, моностеарату і желатину.

5 Стерильні розчини для ін'єкції, можна приготувати шляхом введення у відповідний розчинник активної сполуки у необхідній кількості з одним або комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, як буде потрібно, з подальшою стерилізацією мікрофільтрацією.

10 Як правило, дисперсії готують шляхом введення активної сполуки в стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище і інші необхідні інгредієнти, з числа перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкції, кращими способами приготування є вакуумне висушування і висушування (ліофілізація) сублімацією, які дають порошок активного інгредієнта плюс будь-який додатковий бажаний інгредієнт з його заздалегідь стерильно-профільтрованого розчину.

15 Режими дозування підбирають так, щоб забезпечити оптимальну бажану відповідь (наприклад, терапевтичну відповідь). Наприклад, може бути введена єдина доза, може бути введено декілька окремих доз протягом деякого часу або дозування може бути пропорційно зменшене або збільшене, як диктує гостра необхідність терапевтичної ситуації. Особливо вигідно розробляти парентеральні композиції в стандартній лікарській формі для простоти введення і одноманітності дозування. Стандартна лікарська форма при використанні тут відноситься до фізично дискретних одиниць, придатних як одиничні дозування для суб'єктів, 20 яким потрібне лікування; кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активної сполуки, підраховану так, щоб отримати бажаний терапевтичний ефект, у поєднанні з необхідним фармацевтичним носієм.

25 Приклади фармацевтично прийнятних антиоксидантів включають: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїн гідрохлорид, бісульфат натрію, натрій метабісульфіт, сульфат натрію і тому подібне; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як, аскорбілпальмітат, бутильований гідроксианізол (ВНА), бутильований гідрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол і тому подібне; і (3) металеві хелатуючі агенти, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбітол, винна кислота, фосфорна кислота тощо.

30 Композиції запропоновані даним винаходом включають терапевтичні композиції, придатні для орального, назального, місцевого, (включаючи щокове і під'язикове), ректального, вагінального і/або парентерального введення. Композиції можуть бути зручно представлені в стандартній лікарській формі і можуть бути приготовані будь-якими відомими в області фармацевтики способами. Кількість активного інгредієнта, яку необхідно об'єднати з носієм для отримання стандартної лікарської форми, варіюватиме залежно від суб'єкта, якого необхідно 35 лікувати, і конкретного способу введення. Кількість активного інгредієнта, яку необхідно об'єднати з носієм для отримання стандартної лікарської форми, в більшості випадків буде такою кількістю композиції, яка дає терапевтичний ефект.

40 Композиції запропоновані даним винаходом, придатні для вагінального застосування, також включають вагінальні супозиторії, тампони, креми, гелі, пасти, піни або спреї, які містять придатні носії, відомі в даній галузі техніки. Лікарські форми для місцевого або трансдермального введення композицій даного винаходу включають порошки, спреї, мазі, пасти, креми, лосьйони, гелі, розчини, пластирі і засоби для інгаляції. Активна сполука може бути змішаною в стерильних умовах з фармацевтично прийнятним носієм і з будь-якими 45 консервантами, буферами або пропелентами, які можуть бути потрібними.

Фрази "парентеральне введення" і "введений парентерально", як вони використовуються в описі, означають відмінні від ентерального і місцевого введення способи введення, зазвичай за допомогою ін'єкції і включають, без обмеження, внутрішньовенну, внутрішньом'язову, внутрішньоартеріальну, підоболонкову, внутрішньокапсульну, внутрішньоочнуюмкову, 50 внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, внутрішньоочеревинну, транстрахеальну, підшкірну, внутрішньошкірну, внутрішньосуставну, підкапсулярну, субарахноїдальну, інтраспінальну, епідуральну і внутрішньогрудинну ін'єкцію і вливання.

Приклади відповідних водних і неводних носіїв, які можуть застосовуватися у фармацевтичних композиціях винаходу, включають воду, етанол, поліюли (такі як, гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь тощо) та їх відповідні суміші, рослинні олії, такі як оливкова олія, і складні органічні ефіри для ін'єкції, такі як етилолеат. Належну текучість можна зберегти, наприклад, використовуючи покриття, таке як лецитин, зберігаючи бажаний розмір часточок у 55 випадку дисперсії і використовуючи поверхнево-активні речовини.

60 Ці композиції також можуть містити ад'юванти, такі як консерванти, зволожуючі засоби, емульгуючі речовини і диспергуючі речовини. Запобігання присутності мікроорганізмів можна

забезпечити методами стерилізації, а також включенням різних антибактеріальних і протигрибкових засобів, наприклад, парабену, хлорбутанолу, фенолсорбінової кислоти і тому подібного. Також може бути бажаним включення до композиції ізотонічних засобів, таких як цукру, хлориду натрію тощо. Крім того, тривале всмоктування фармацевтичної форми, яка ін'єктується, може досягатися включенням засобів, які затримують всмоктування, таких як алюміній моностеарат і желатин.

Незалежно від обраного способу введення сполуки даного винаходу, яка може використовуватися у придатній формі гідрату, і/або фармацевтичні композиції запропоновані даним винаходом входять до складу фармацевтично прийнятних лікарських форм за допомогою звичайних методів, відомих фахівцям в даній галузі техніки.

Фактичні рівні дозувань активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях даного винаходу можуть варіювати так, щоб отримати кількість активного інгредієнта, яка є ефективною для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для окремого пацієнта, композиції і способу введення, але не є токсичними для пацієнта. Вибраний рівень дозування залежатиме від цілого ряду фармакокінетичних чинників, включаючи активність окремих застосованих композицій даного винаходу, спосіб введення, час введення, швидкість виведення конкретної використаної сполуки, тривалість лікування, інші лікарські засоби, сполуки і/або речовини, які використовуються в комбінації з конкретними застосованими сполуками, вік, стать, вагу, стан, загальний стан здоров'я і попередню історію хвороби пацієнта, якого необхідно лікувати, і подібних чинників, добре відомих в медицині.

Лікар або ветеринар, який є фахівцем в даній галузі, може легко визначити і призначити потрібну ефективну кількість фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар або ветеринар може почати призначати дозування сполук винаходу, які вживаються у фармацевтичній композиції, з рівнів нижчих, ніж необхідні для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, і поступово збільшувати дозування до досягнення бажаного результату. Загалом, придатна щоденна доза композиції винаходу буде такою кількістю сполуки, яка є найнижчим дозуванням, ефективним для отримання терапевтичного ефекту. Як правило, така ефективна доза залежатиме від чинників, описаних вище. Бажано, щоб введення було внутрішньовенним, внутрішньом'язовим, внутрішньоочеревинним або підшкірним введенням, бажано введенням, розташованим проксимально щодо місцеположення мішені. За необхідності ефективна щоденна доза терапевтичної композиції може бути введена у вигляді двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше субдоз, введених окремо з відповідними інтервалами впродовж всього дня, необов'язково в стандартних лікарських формах. Не дивлячись на те, що можливе введення сполуки даного винаходу окремо, бажаним є введення сполуки у вигляді фармацевтичної композиції.

У одному варіанті здійснення антитіла запропоновані винаходом можуть бути введені за допомогою вливання (інфузії), бажано повільного неперервного вливання протягом тривалого періоду, наприклад, більше 24 годин, для того, щоб зменшити токсичні побічні дії. Введення також може здійснюватися шляхом неперервного вливання протягом періоду від 2 до 24 годин, наприклад, від 2 до 12 годин. Такий режим може повторюватися один або більше разів, за потреби, наприклад, через 6 місяців або 12 місяців. Дозування можна визначити і відрегулювати, вимірюючи кількості циркулюючих моноклональних анти-CLDN6 антитіл після введення в біологічному зразку, використовуючи анти-ідіотипові антитіла, націлені на анти-CLDN6 антитіла.

У іншому варіанті здійснення антитіла вводяться як підтримуюча терапія, наприклад, один раз на тиждень протягом періоду з 6 місяців або більше.

У іншому варіанті здійснення антитіла згідно винаходу можуть вводитися за допомогою режиму, який передбачає одне вливання антитіл проти CLDN6, а потім вливання антитіл проти CLDN6, кон'югованого з радіоізотопом. Цей режим можна повторити, наприклад, через 7-9 днів.

У одному варіанті здійснення винаходу терапевтичні сполуки винаходу введені в ліпосоми. У кращому варіанті здійснення ліпосоми включають націлюючий фрагмент (частку). У найкращому варіанті здійснення терапевтичні сполуки в ліпосомах доставляються шляхом болюсного вливання в місце, розташоване проксимально відносно бажаної області, наприклад, місцеположення пухлини. Композиція може бути текучою до такого ступеня, щоб легко вводилася за допомогою шприца. Композиція повинна бути стійкою в умовах виробництва і зберігання і повинна бути захищена від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби.

У додатковому варіанті здійснення антитіла запропоновані винаходом можуть бути розроблені так, щоб запобігти або зменшити їх транспорт крізь плаценту. Це можна зробити за допомогою відомих в даній галузі техніки методів, наприклад, шляхом пегілювання антитіла або

шляхом використання F(ab) 2" фрагментів. Як додаткові посилання можна згадати "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation.» J. Immunol. Methods, 152: 177-190; і то "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol.» 74: 279-283.

"Терапевтично ефективну дозу" для лікування пухлин можна оцінити (визначити) за реальною відповіддю пухлини, при цьому відповідь може бути повною або частковою. Повна відповідь (CR) визначається як відсутність клінічного, радіологічного або іншого наочного підтвердження хвороби. Часткова відповідь (PR) – це зменшення загального розміру пухлини більше, ніж на 50 %. Середній час прогресу є мірою, яка характеризує тривалість об'єктивної відповіді пухлини.

"Терапевтично ефективну дозу" для лікування пухлин можна також оцінити за її можливістю стабілізувати прогрес хвороби. Здатність сполуки інгібувати (припиняти) рак можна оцінити за допомогою тваринної моделі, яка прогнозує ефективність на пухлинах людини. Альтернативно, цю властивість композиції можна оцінити, вивчивши можливість сполуки інгібувати ріст клітин або (викликати) апоптоз за допомогою методів дослідження *in vitro*, відомих кваліфікованим практикам. Терапевтично ефективна кількість терапевтичної сполуки може зменшити розмір пухлини або іншим чином поліпшити симптоми у суб'єкта. Фахівець в даній галузі буде здатний визначити такі кількості, виходячи з таких чинників, як розмір суб'єкта, тяжкість симптомів у суб'єкта і обраної конкретної композиції або способу введення.

Композиція повинна бути стерильною і текучою до такого ступеня, щоб її можна було ввести за допомогою шприца. Окрім води, носій може бути ізотонічним, забуференим сольовим розчином, етанолом, поліолом (наприклад, гліцерином, пропіленгліколем і рідким поліетиленгліколем тощо) та їх відповідними сумішами. Належну текучість можна зберегти, наприклад, використовуючи покриття, такі як лецитин, зберігаючи бажаний розмір частинок у випадку дисперсії і використовуючи поверхнево-активні речовини. У багатьох випадках бажаним є включення до композиції ізотонічних засобів, таких як, цукри, поліспирти, такі як манітол, сорбітол або хлорид натрію. Тривале всмоктування композицій, для цій може досягатися включенням до композиції засобу, який затримує всмоктування, наприклад, алюмінію моностеарата і желатину.

Коли активна сполука відповідним чином захищена, як описано вище, сполуку можна вводити перорально, наприклад, з інертним розчинником або засвоєним істивним носієм.

IV. Застосування і способи винаходу

Антитіла (включаючи імунокон'югати, біспецифічні/мультиспецифічні молекули, композиції та інші похідні, описані тут) даного винаходу мають численні можливості терапевтичного застосування, які стосуються лікування порушень, які торкаються клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Наприклад, антитіла можуть бути введені в клітини в культурі, наприклад, *in vitro* або *ex vivo*, або суб'єктові-людині, наприклад, *in vivo*, з метою лікування або запобігання цілому ряду порушень, таких як описані тут. Переважно суб'єкти включають пацієнтів-людей, які мають порушення, які можна скоректувати або поліпшити, знищивши уражені хворобою клітини, зокрема, клітини, які характеризуються зміненою експресією CLDN6 і/або зміненим зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею в порівнянні з нормальними клітинами.

Наприклад, в одному варіанті здійснення антитіла запропоновані даним винаходом можна використовувати для лікування суб'єкта з онкогенним порушенням, наприклад, порушенням, яке характеризується наявністю пухлинних клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Приклади онкогенних хвороб, які можна лікувати і/або запобігти, включають всі види раку, які експресують CLDN6, і пухлинні форми, включаючи, описані тут.

Фармацевтичні композиції і способи лікування, описані згідно винаходу, також можуть використовуватися для імунізації або вакцинації з метою запобігти хворобі, описаній тут.

У інших варіантах здійснення антитіла запропоновані винаходом можуть використовуватися для встановлення рівнів CLDN6 або конкретних форм CLDN6, або рівнів клітин, які містять CLDN6 на поверхні мембран, причому потім рівні можна пов'язати з певними хворобами або симптомами хвороб, таких як описані вище. Альтернативно, антитіла можна використовувати для виснаження або впливу на функціонування клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, показуючи тим самим, що ці клітини є важливими посередниками хвороби. Це може досягатися шляхом контакту зразка і контрольного зразка з анти-CLDN6 антитілом за умов, які допускають утворення комплексу між антитілом і CLDN6. Будь-які утворені антитілом і CLDN6 комплекси виявляють і порівнюють в

зразку і в контрольному зразку, тобто еталонному зразку.

На початку антитіла запропоновані винаходом можна протестувати щодо їх активності зв'язування, співвіднесеної з терапевтичним або діагностичним застосуванням *in vitro*. Наприклад, антитіла можна протестувати за допомогою проточної цитометрії, як описано тут.

Антитіла запропоновані винаходом можна використовувати для виявлення *in vivo* або *in vitro* однієї або більше з поміж наступних біологічних активностей: інгібувати зростання і/або диференціювання клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею; знищувати клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею; опосередкувати фагоцитоз або ADCC клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, у присутності ефektorних клітин; опосередкувати CDC клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, у присутності комплементу; опосередкувати апоптоз клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею; індукувати гомотипічну адгезію і/або викликати переміщення в ліпідні "плоти" після зв'язування CLDN6.

У окремому варіанті здійснення антитіла використовуються *in vivo* або *in vitro* для того, щоб лікувати, запобігати або діагностувати ряд хвороб, пов'язаних з CLDN6. Приклади хвороб, пов'язаних з CLDN6, включають, серед інших типи раку, такі як описані тут.

Як описано вище, анти-CLDN6 антитіла запропоновані винаходом можуть бути введені спільно з одним або більше іншими терапевтичними засобами, наприклад, цитотоксичним засобом, радіотоксичним засобом, антиангіогенним засобом або імуносупресорним засобом, щоб зменшити індукцію імунних відповідей проти антитіл запропонованих даним винаходом. Антитіло може бути пов'язаним із засобом (як імунокомплекс) або може вводитися окремо від засобу. У останньому випадку (окреме введення) антитіло може бути введено до, після або одночасно із засобом або може бути введено спільно з іншими відомими методами лікування, наприклад, протираковою терапією, наприклад, опромінюванням. Такі терапевтичні засоби включають, серед інших, анти-неопластичні засоби, як перераховані вище. Спільне введення анти-CLDN6 антитіл даного винаходу із засобами хіміотерапії надає два протиракові засоби, які діють за допомогою різних механізмів, які цитотоксично впливають на пухлинні клітини. Таке спільне введення може вирішити проблеми, пов'язані з розвитком резистентності до лікарських засобів або зміною антигенності пухлинних клітин, коли вони не вступають в реакцію з антитілом.

Композиції (наприклад, антитіла, мультиспецифічні і біспецифічні молекули і імунокон'югати) винаходу, які мають сайти зв'язування комплементу, такі як частини IgG1-2 або -3 або IgM, які зв'язують комплемент, також можуть використовуватися у присутності комплементу. У одному варіанті здійснення обробка *ex vivo* популяції клітин, що містять клітини-мішені, зв'язуючим засобом винаходу і відповідних ефektorних клітин може доповнюватися додаванням комплементу або сироватки, яка містить комплемент. Фагоцитоз клітин-мішеней, покритих зв'язуючим агентом винаходу, може бути покращено зв'язуванням білків комплементу. У іншому варіанті здійснення клітини-мішені, покриті композиціями винаходу, також можуть бути лізовані комплементом. У ще одному варіанті здійснення композиції винаходу не активують комплемент.

Крім того, композиції винаходу також можуть бути введені разом з комплементом. Відповідно, в рамках винаходу знаходяться композиції, які містять антитіла, мультиспецифічні або біспецифічні молекули і сироватку або комплемент. Ці композиції вигідні тим, що комплемент розташовується в безпосередній близькості до антитіл, мультиспецифічних або біспецифічних молекул.

Альтернативно, антитіла, мультиспецифічні або біспецифічні молекули винаходу і комплемент або сироватка можуть бути введені окремо. Зв'язування композицій даного винаходу з клітинами-мішенями може викликати переміщення комплексу CLDN6 антиген-антитіло в ліпідні "плоти" клітинної мембрани. Таке переміщення створює високу щільність комплексів антиген-антитіло, що може ефективно активувати або підсилити CDC.

Крім того, в рамках даного винаходу знаходяться набори, які містять композиції антитіл запропонованих даним винаходом (наприклад, антитіла і імунокон'югати) та інструкції щодо їх застосування. Набір може додатково містити один або більше додаткових реагентів, таких як імуносупресорний засіб, цитотоксичний засіб або радіотоксичний засіб, або одне або більше додаткових антитіл запропонованих даним винаходом (наприклад, антитіло, яке має комплементарну активність).

Відповідно, пацієнтам, яких лікують композиціями антитіл запропонованих даним винаходом, додатково може вводитися (до, одночасно або після введення антитіла запропонованого винаходом) інший терапевтичний засіб, такий як цитотоксичний або

радіотоксичний засіб, який підсилює або підвищує терапевтичний ефект антитіл запропонованих даним винаходом.

У інших варіантах здійснення суб'єкта можна додатково лікувати модулюючими засобами, наприклад, які підсилюють або інгібують, експресію і активність Fc-гамма або Fc-альфа рецепторів, наприклад, лікувати суб'єкта цитокінами. Кращі цитокіни включають гранулоцитарний колонієстимулюючий чинник (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий чинник (GM-CSF), інтерферон- γ (IFN- γ) і чинник некрозу пухлин (TNF). Іншими важливими засобами для підвищення терапевтичної ефективності антитіл і фармацевтичних композицій, описаних тут, є β -глюкани, гомополісахариди розгалужених залишків глюкози, які продукуються цілим рядом рослин і мікроорганізмів, наприклад, бактеріями, водоростями, грибами, дріжджами і хлібними злаками. Також можуть використовуватися фрагменти β -глюканів, які продукуються організмами. Бажано β -глюкан є полімером $\beta(1,3)$ глюкози, в якому, щонайменше, деякі з глюкозних одиниць скелету, наприклад, 3-6 % глюкозних залишків скелету, мають гілки, такі як $\beta(1,6)$ відгалуження.

У окремому варіанті здійснення винахід пропонує способи виявлення наявності CLDN6 антигену в зразку, або вимірювання кількості CLDN6-антигена, які передбачають контакт зразка і контрольного зразка з антитілом, яке специфічно зв'язується з CLDN6, за умов, що допускають утворення комплексу між антитілом або його частиною і CLDN6. Потім визначається утворення комплексу, при цьому відмінність між утворенням комплексу в зразку в порівнянні з контрольним зразком служить ознакою наявності CLDN6-антигена в зразку.

У іншому варіанті здійснення винахід пропонує спосіб визначення наявності або визначення кількості клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею *in vivo* або *in vitro*. Спосіб передбачає (i) введення суб'єктові композиції винаходу, сполученої з виявленим маркером, і (ii) проведення виявлення у суб'єкта вказаного виявленого маркера за допомогою засобів виявлення, щоб встановити області, які містять клітини, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею. Описані вище способи є придатними, зокрема, для діагностування хвороб, пов'язаних з CLDN6, і/або локалізації хвороб, пов'язаних з CLDN6, таких як ракові хвороби. Збільшена кількість CLDN6 в зразку, вища, ніж кількість CLDN6 в контрольному зразку, служить ознакою наявності хвороби, пов'язаної з CLDN6, у суб'єкта, зокрема людини, від якої отриманий даний зразок.

При використанні в описаних вище способах описане тут антитіло може бути надане з міткою, яка функціонує щоб: (i) надати виявлений сигнал; (ii) взаємодіяти з іншою міткою, щоб модифікувати виявлений сигнал, який надається першою або другою міткою, наприклад, FRET (флуоресцентне резонансне перенесення енергії); (iii) впливати на рухливість, наприклад, електрофоретичну рухливість, за допомогою заряду, гідрофобності, форми або інших фізичних параметрів, або (iv) забезпечити захоплення частинки, наприклад, афінність (спорідненість), антитіло/антиген або іонне комплексоутворення. Придатними мітками є такі структури, як флуоресцентні мітки, люмінесцентні мітки, хромофорні мітки, радіоізотопні мітки, ізотопні мітки, бажано стабільні ізотопні мітки, ізобарні мітки, ферментні мітки, мітки у вигляді часточок, зокрема металічних часточок, магнітних часточок, полімерних часточок, невеликі органічні молекули, такі як біотин, ліганди рецепторів або зв'язуючі молекули, такі як білки клітинної адгезії або лектини, мічені послідовності, які містять нуклеїновокислотні і/або амінокислотні залишки, які можна виявити, використовуючи зв'язуючі агенти тощо. Мітки включають, без обмеження, сульфат барію, йоцетамову кислоту, іопаноеву кислоту, іподат кальцію, натрію диатризоат, меглумін диатризоат, метризамід, натрію тиропаноев і радіодіагностичні, включаючи випромінювачі позитронів, такі як фтор-18 і вуглець-11, гамма-випромінювачі, такі як йод-123, технецій-99m, йод-131 і індій-111, нукліди для ядерного магнітного резонансу, такі як фтор і гадоліній.

У іншому варіанті здійснення імунокон'югати винаходу можуть використовуватися для націлювання сполук (наприклад, терапевтичних засобів, міток, цитотоксинів, радіотоксинів, імуносупресорів тощо) на клітини, які мають CLDN6 сполучений з поверхнею, шляхом зв'язування таких сполук з антитілом. Таким чином, винахід також пропонує способи локалізації *ex vivo* або *in vitro* клітин, які експресують CLDN6 і які характеризуються зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, наприклад, циркулюючих пухлинних клітин.

Даний винахід додатково проілюстрований за допомогою наступних прикладів, які не слід тлумачити як такі, що обмежують рамки винаходу.

Приклади

Використані тут процедури і методи описуються і здійснюються власне відомим способом і як описано, наприклад, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Всі методи, включаючи

використання наборів і реагентів, здійснюються відповідно до інструкцій виробника, якщо спеціально не вказане інше.

Приклад 1. Кількісне визначення експресії CLDN6 в нормальних тканинах, ракових тканинах і лініях клітин за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією в масштабі реального часу (RT-ПЛР)

Загальну клітинну РНК екстрагували із заморожених зразків тканини і ліній ракових клітин за допомогою набору RNeasy Mini Kit (Qiagen), гібридизували (primed with) dT₁₈ олігонуклеотидом і піддавали реакції зворотної транскрипції з Superscript II (GIBCO/Lifetech) відповідно до рекомендацій виробника. Цілісність отриманої кДНК перевіряли шляхом ампліфікації транскриптів р53 протягом 30 циклів ПЛР. Після нормування по HPRT кількісно визначили експресію CLDN6 за допомогою обчислення SSCT.

Був протестований кожен нормальний тип тканини від трьох індивідумів. У нормальних тканинах було виявити тільки кількості слідів транскриптів CLDN6 після проведення 40 циклів RT-ПЛР. Єдиною нормальною тканиною, яка трохи перевершує мінімальну експресію, була плацента.

На відміну від нормальних тканин, висока експресія CLDN6 була виявлена в зразках карциноми яєчника (аденокарциноми), раку легенів (NSCLC, з найвищою частотою і рівнями експресії в аденокарциноми), раку шлунку, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри (базальноклітинна карцинома і плоскоклітинна карцинома), злоякісної меланоми, раку голови і шиї (злоякісна плеоморфна аденома), саркоми (синовіальна саркома і карциносаркома), раку жовчних проток, нирковоклітинного раку (світлоклітинна карцинома і папілярна карцинома), раку матки і ракових клітинних ліній A2780 (карцинома яєчника), NIH-OVCAR3 (карцинома яєчника), HCT-116 (рак товстого кишечника), EFO-27 (карцинома яєчника), CPC-N (SCLC), NCI-H552 (NSCLC), SNU-1 (рак шлунку), KATOIII (рак шлунку), YAPC (рак підшлункової залози), AGS (рак шлунку), FU97 (рак шлунку), MKN7 (рак шлунку).

Приклад 2. Кількісне визначення експресії CLDN6 в нормальних тканинах, тканинах раку і лініях клітин за допомогою Вестерн-блотінга

Для Вестерн-блотінга використовували 20 мкг загального білка, виділеного з клітин, лізованих за допомогою лізуючого буфера Лемлі. Екстракти розводили в відновлюючому буфері для зразка (Roth), проводили SDS-PAGE і потім переносили електроблотінгом на PVDF-мембрану (Pall). Імунофарбування проводили з використанням поліклональних антитіл до CLDN6 (ARP) і бета-актину (Abcam) з подальшим виявленням первинних антитіл за допомогою кон'югованих з пероксидазою хрину козячих антимишачих і козячих антикролячих вторинних антитіл (Dako).

Був протестований лізат кожної нормальної тканини від п'яти індивідумів. Експресія білка CLDN6 не була виявлена ні в одній з досліджених нормальних тканин. На відміну від нормальних тканин, висока експресія білка CLDN6 була виявлена в зразках карциноми яєчника і раку легені. Експресія CLDN6 була виявлена в NIH-OVCAR3 (карцинома яєчника), MKN7 (рак шлунку), AGS (рак шлунку), CPC-N (SCLC), HCT-116 (рак товстої кишки), FU97 (рак шлунку), NEC8 (ембріональна карцинома яєчка), JAR (плацентарна хоріокарцинома), JEG3 (плацентарна хоріокарцинома), BEWO (плацентарна хоріокарцинома) і PA-1 (тератокарцинома яєчника).

Приклад 3. Імуногістохімічний (IHC) аналіз експресії CLDN6 в нормальних тканинах і ракових тканинах

Зрізи тканин (4 мкм), залитих в парафін, інкубували протягом 1 години при 58 °C на платформі з підігрівом (HI 1220, Leica). Парафін видаляли із зрізів, інкубуючи зрізи в Roticlear (Roth) протягом 2 × 10 хвилин за кімнатної температури. Потім зрізи регідрували в наборі спиртів із ступінчастою концентрацією (99 %, 2 × 96 %, 80 % і 70 %, 5 хвилин в кожному). Вилучення антигену здійснювали кип'ятінням мікроскопічних препаратів (слайдів) при 120 °C (15 psi) протягом 15 хвилин в 10 мМ цитратному буфері (pH 6,0) + 0,05 % Твін-20. Відразу після кип'ятіння препарати інкубували в PBS протягом 5 хвилин. Активність ендогенної пероксидази блокували 0,3 % пероксидом водню в МЕОН протягом 15 хвилин за кімнатної температури. Щоб уникнути неспецифічного зв'язування, препарати блокували 10 % козячою сироваткою в PBS протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Після цього, препарати інкубували з CLDN6-специфічними поліклональними антитілами (1 мкг/мл) (ARP) протягом ночі при 4 °C. Наступного дня препарати промили PBS за кімнатної температури (3 × 5 хвилин) і інкубували з 100 мкл вторинних антитіл (PowerVision полі HRP-анти-кролик IgG, готові до використання (ImmunoLogic)) протягом 1 години за кімнатної температури. Після цього, препарати промили PBS за кімнатної температури (3 × 5 хвилин). Остаточне фарбування проводили, використовуючи набір VECTOR NOVARED Substrate Kit SK-4800 від Vector Laboratories

(Burlingame). Зрізи дофарбовували гематоксиліном протягом 90 сек за кімнатної температури. Після зневоднення в наборі спиртів із зростаючою концентрацією (70 %, 80 %, 2 × 96 % і 99 %, 5 хвилин в кожному), і 10 хвилинної інкубації в ксилолі препарати покривали за допомогою набору X-tra Kit (Meditate Histotechnic).

Експресія білка CLDN6 не була виявлена в нормальних тканинах легені, яєчника, шлунку, товстої кишки, підшлункової залози, печінки, дванадцятипалої кишки або нирки. На відміну від нормальних тканин, сильне або, щонайменше, значне фарбування спостерігалось в зрізах уражених тканин, таких як тканини з карциномою яєчника, раком легені, раком шкіри, раком підшлункової залози, раком шлунку, раком молочної залози, раком сечового міхура (перехідно-клітинна карцинома), раком шийки матки, раком яєчка (семінома) і раком матки. Виразно акцентоване фарбування спостерігалось на плазматичних мембранах епітеліальних клітин злоякісної популяції, тоді як прилеглі стромальні і незлоякісні епітеліальні клітини не забарвлювалися. Ці результати демонструють, що білок CLDN6 розташовується на плазматичній мембрані злоякісних клітин.

Приклад 4. Отримання мишачих антитіл до CLDN6

а. Отримання векторів експресії, які кодують повнорозмірний CLDN6 і фрагменти CLDN6

Штучна кодон-оптимізована послідовність ДНК (SEQ ID NO: 3), яка кодує повнорозмірний CLDN6 (NCBI реєстраційний номер NP_067018.2, SEQ ID NO: 2), була отримана за допомогою хімічного синтезу (GENEART AG, Німеччина) і клонована у вектор pcDNA3.1/мус-His (Invitrogen, США), утворивши вектор p3953. Вставка стоп-кодона давала можливість експресії білка CLDN6 без з'єднання з вектором, який кодує мус-His tag. Експресію CLDN6 перевірили за допомогою Вестерн-блотінга, проточної цитометрії і імунофлуоресцентного аналізу з використанням комерційно доступних анти-CLDN6 антитіл (ARP, 01-8865; R&D Systems, MAB3656).

Крім того, була отримана кодон-оптимізована послідовність ДНК (SEQ ID NO: 4), яка кодує очікуваний позаклітинний фрагмент домену 2 (EC2) CLDN6 (SEQ ID NO: 6) при об'єднанні з N-кінцевою Ig каппа лідерною послідовністю, отриманою від сигнального пептиду, а потім 4 додатковими амінокислотами, щоб забезпечити відповідну ділянку рестрикції сигнальною пептидази (SEQ ID NO: 5), і клонована в pcDNA3.1/мус-His вектор, утворюючи вектор p3974. До імунізації експресія фрагмента EC2 була підтверджена за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії на транз'єнтно трансфікованих і фіксованих параформальдегідом (PFA) клітинах CHO-K1 за допомогою комерційно доступних анти-мус антитіл (Cell Signaling, MAB 2276).

б. Отримання клітинних ліній, які стабільно експресують CLDN6

Клітинні лінії HEK293 і P3 × 63Ag8U.I, які стабільно експресують CLDN6, були отримані за допомогою стандартних методів з використанням вектора p3953.

в. Імунізація.

Мишей Balb/c імунізували 25 мкг плазмідною ДНК p3974 разом з 4 мкл PEI-манози (PEI-Man; in vivo-jetPEI™-Man від компанії PolyPlus Transfection) (150 mM PEI-Man в H₂O з 5 % глюкози) шляхом внутрішньоочередової ін'єкції в 0, 16 і 36 днів. На 48 день і 62 день мишей імунізували шляхом внутрішньоочередової ін'єкції мієломними клітинами P3 × 63Ag8U.I, трансфікованими вектором p3953 для стабільної експресії CLDN6. Клітини, введені на 62 день, до ін'єкції опромінювали 3000 радій. Наявність антитіл проти CLDN6 в сироватці мишей контролювали за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії між днями 20 і 70, використовуючи CHO-K1 клітини, ко-трансфіковані нуклеїновими кислотами, які кодують CLDN6 і GFP. Для цього через 24 години після трансфекції PFA-фіксовані або нефіксовані клітини інкубували з сироваткою від імунізованих мишей при розведенні 1:100 протягом 45 хвилин за кімнатної температури (RT). Клітини промивали, інкубували з міченими Alexa555 анти-мишачими Ig антитілами (Molecular Probes) і досліджували за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

У зразках сироватки, отриманої від миші, на основі якої була отримана гібридома F3-6C3-H8, були виявлені анти-CLDN6 специфічні антитіла; див. Фіг. 2.

Для отримання моноклональних антитіл мишей з виявленими анти-CLDN6 імунними відповідями стимулювали за чотири дні до спленектомії за допомогою внутрішньоочередової ін'єкції 2 × 10⁷ клітин HEK293, стабільно трансфікованих вектором p3953.

д. Отримання гібридом, які продукують мишачі моноклональні антитіла до CLDN6

Спленоцити (6 × 10⁷), виділені з імунізованої миші, були сполучені з клітинами (3 × 10⁷) мієломи мишей P3 × 63Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) за допомогою PEG 1500 (Roche, CRL 10783641001). Клітини висівали приблизно 5 × 10⁴ клітин на комірку в титраційні мікропланшети з плоским дном і культивували приблизно протягом двох тижнів в селективному середовищі RPMI, яке містить 10 % інактивованої нагріванням ембріональної телячої сироватки, 1 % добавок для зростання клітин (hybridoma fusion and cloning supplement) (HFCs, Roche, CRL 11363735), 10 mM HEPES, 1 mM пірувату натрію, 4,5 % глюкози, 0,1 mM 2-меркаптоетанол, 1 ×

пеніцилін/стрептоміцин і 1 × НАТ добавки (Invitrogen, CRL 21060). Через 10-14 днів окремі комірочки скринували за допомогою проточної цитометрії на анти-CLDN6 моноклональні антитіла. Секретуючі антитіла гібридами були субклоновані методом серійних розведень і знову протестовані на анти-CLDN6 моноклональні антитіла. Стабільні субклони культивували в середовищі для культури тканини, щоб отримати невеликі кількості антитіл для характеристики. Від кожної гібридомии був вибраний, щонайменше, один клон, який зберіг реакційну здатність материнських клітин (перевірено за допомогою проточної цитометрії). Для кожного клону були створені панелі з дев'яти ампул, які зберігали в рідкому азоті.

Приклад 5. Характеристики зв'язування супернатантів, отриманих від гібридом і моноклональних антитіл.

а. Контроль якості тимчасово трансфікованих клітин HEK293T за допомогою (i) Вестерн-блотінга і (ii) проточної цитометрії

(i) Клітини HEK293T були трансфіковані нуклеїновими кислотами, які кодують CLDN3, CLDN4, CLDN6, і CLDN9, відповідно, або фіктивно-трансфіковані. Експресію CLDN3, CLDN4, CLDN6 або CLDN9 в клітинах HEK293T визначали за допомогою Вестерн-блотінга. Для цього клітини збирали через 24 години після трансфекції і лізували. Лізат піддавали ДСН-електрофорезу (SDS-PAGE), переносили на мембрану нітроцелюлози і фарбували анти-CLDN3 (A) (Invitrogen, 34-1700), анти-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), анти-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) або анти-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672) антитілами, які специфічно зв'язувалися з С-кінцем відповідного клаудину за денатуруючих умов. Після інкубації з міченими пероксидазою вторинними антитілами і проявлення реагентом ECL використовували барвник LAS-3000 (Fuji) для візуалізації. Смуги очікуваних молекулярних мас CLDN3, CLDN4, CLDN6 і CLDN9, відповідно, спостерігалися тільки в трансфікованих клітинах, але не в контрольних клітинах (Фіг. 3), показуючи, що клітини HEK293T не експресують ендегенно який-небудь з досліджених клаудинів і, таким чином, є придатним інструментом для визначення перехресної реактивності CLDN6-антитіл.

(ii) Клітини HEK293T (i) були додатково проаналізовані методом проточної цитометрії з використанням анти-CLDN-антитіл, які розпізнають нативні епітопи (анти-CLDN3 IgG2a миші (R&D, MAB4620), анти-CLDN4 IgG2a миші (R&D, MAB4219), анти-CLDN6 IgG2b миші (R&D, MAB3656)). Антитіла, отримані від компанії Sigma під серійними номерами M9144 і M8894, служили контролюми ізо типу. Специфічність цих анти-CLDN-антитіл була проаналізована за допомогою клітин HEK293T, тимчасово трансфікованих нуклеїновими кислотами, які кодують CLDN3, CLDN4, CLDN6, і CLDN9, відповідно. Анти-CLDN6 антитіла проявляли перехресну реактивність щодо CLDN3, CLDN4 і CLDN9. Анти-CLDN4 антитіла проявляли перехресну реактивність щодо CLDN3, CLDN6 і CLDN9. Анти-CLDN3 антитіла специфічно зв'язувалися з CLDN3 (Фіг. 4).

б. Визначення специфічності моноклональних антитіл, отриманих відповідно до винаходу, за допомогою проточної цитометрії

Клітини HEK293T були ко-трансфіковані вектором, який кодує різні білки CLDN, і вектором, який кодує флуоресцентний маркер. Через 24 години після трансфекції клітини зібрали за допомогою 0,05 % розчину трипсин/ЕДТА і промили буфером FACS (PBS, що містить 2 % FCS і 0,1 % азиду натрію). Клітини перенесли в титраційні мікропланшети з U-подібним дном в кількості 2×10^5 клітин на комірку і інкубували протягом 60 хвилин при 4 °C з супернатантами від гібридомии. Після промивки буфером FACS (три рази) клітини інкубували з кон'югованими з алофікоціаніном (APC) анти-миша IgG I+2a+2b+3 специфічними вторинними антитілами (Dianova, 115-135-164). Після цього клітини двічі промили, а величину зв'язування оцінили методом проточної цитометрії за допомогою BD FACSAarray (Фіг. 5). Експресію флуоресцентного маркера наносили на вісь абсцис відносно зв'язування антитіл по осі ординат. Як позитивний контроль використовували комерційно доступні анти-CLDN6 IgG2b антитіла миші (R&D, MAB3656), а антитіла від компанії Sigma під серійним номером M8894 служили контролем ізо типу.

Антитіла в супернатантах від моноклональних субклонів гібридомии F3-6C3-H2, F3-6C3-H8, F3-6C3-H9, F3-6C3-D8 і F3-6C3-G4, всі отримані від гібридомии F3-6C3, були специфічними до CLDN6 і не зв'язувалися з CLDN9, CLDN3 і CLDN4. Наприклад, Фіг. 5А показує результати для моноклонального субклону гібридомии F3-6C3-H8. Антитіла в супернатантах від моноклонального субклону гібридомии F3-6C3-H8 також зв'язувалися з клітинами, трансфікованими варіантом (1143V) -SNP CLDN6. Антитіла в супернатанті від моноклонального субклону гібридомии F4-4F7-F2 зв'язувалися як з CLDN6, так і з CLDN9 (Фіг. 5А). Антитіла в супернатанті від моноклонального субклону гібридомии F3-7B3-B4 зв'язувалися з CLDN6, CLDN3 і CLDN9 (Фіг. 5В). Антитіла в супернатанті від моноклонального субклону гібридомии F3-3F7-A5

зв'язувалися з CLDN6, CLDN4 і CLDN9 (Fig. 5B).

Приклад 6: Отримання і тестування моноклональних антитіл до CLDN6

а. Отримання вектора експресії, який кодує позаклітинний домен CLDN6

Кодон-оптимізована послідовність ДНК (SEQ ID NO: 12), яка кодує очікуваний позаклітинний фрагмент домену 1 (EC1) CLDN6 (SEQ ID NO: 7), об'єднана з N-кінцевою Ig каппа лідерною послідовністю, отриманою від сигнального пептиду, а потім 4 додатковими амінокислотами, щоб забезпечити відповідну ділянку рестрикції сигнальної пептидази (SEQ ID NO: 13), була отримана і клонована в pcDNA3.1/мус-His вектор, утворюючи вектор p3973. До імунізації експресія фрагмента EC1 була підтверджена за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії на тимчасово трансфікованих і фіксованих параформальдегідом (PFA) клітинах CHO-K1 за допомогою комерційно доступних анти-мус антитіл (Cell Signaling, MAB 2276).

b. Імунізація

Мишей Balb/c імунізували 25 мкг плазмідною ДНК p3973 разом з 4 мкл PEI-манози (PEI-Man; in vivo-jetPEI™-Man від компанії PolyPlus Transfection) (150 mM PEI-Man в H₂O з 5 % глюкози) за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції на 0 і 14 день. На 28 і 44 день мишей імунізували підшкірно KLH-кон'югованими пептидами SEQ ID NO: 14 і SEQ ID NO: 15 (100 мкг кожного в PBS, JPT Peptide Technologies GMBH, Німеччина) разом з очищеним за допомогою ВЕЖХ РТО-СрG-ODN (25 мкг в PBS; 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT; Eurofins MWG Operon, Німеччина). На 64, 77 і 97 день мишей імунізували за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 2×10^7 P3 × 63Ag8U.I клітин мієломи, трансфікованих вектором p3953 для стабільної експресії CLDN6. Перед введенням клітини були оброблені мітоміцином C (2,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, M4287). На 64 і 97 день клітини були введені разом з очищеним за допомогою ВЕЖХ РТО-СрG-ODN (50 мкг в PBS), а на 77 день разом з неповним ад'ювантом Фрейнда. Для продукування моноклональних антитіл, мишей з детектованою анти-CLDN6 імунною відповіддю стимулювали за чотири дні до спленектомії за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції 2×10^7 клітин HEK293, стабільно трансфікованих вектором p3953.

с. Тестування моноклональних антитіл до CLDN6

Проточна цитометрія

Для тестування зв'язування моноклональних антитіл з CLDN6 і його гомологами, клітини HEK293T були тимчасово трансфіковані відповідною кодуючою клаудин плазмідною, при цьому експресію аналізували проточною цитометрією. Щоб розрізнити трансфіковані і нетрансфіковані клітини, клітини HEK293T були котрансфіковані флуоресцентним маркером як репортер. Через 24 години після трансфекції клітини збирали за допомогою 0,05 % трипсин/EDTA, промивали буфером FACS (PBS, який містить 2 % FCS і 0,1 % азиду натрію) і ресуспендували в FACS-буфері в концентрації 2×10^6 клітин/мл. 100 мкл клітинної суспензії інкубували з відповідними антитілами у вказаних концентраціях протягом 30 хвилин при 4 °C. Антитіла, які проявляють перехресну реакційну здатність, використовували для детекції експресії CLDN6 і CLDN9. Комерційно доступні мишачі анти-клаудин антитіла анти-CLDN3 (R&D, MAB4620) і анти-CLDN4 (R&D, MAB4219) служили позитивним контролем, тоді як мишачі IgG2a (Sigma, M9144) і IgG2b (Sigma, M8894), відповідно, служили контролем ізотипу. Клітини тричі промивали FACS-буфером і інкубували з APC-кон'югованими анти-мишачими IgG I+2a+2b+3a специфічними вторинними антитілами (Dianova, 115-135-164) протягом 30 хвилин при 4 °C. Клітини двічі промивали і ресуспендували в FACS-буфері. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії з використанням BD FACSArya. Експресію флуоресцентного маркера наносили на графік по осі абсцис відносно зв'язування антитіла по осі ординат.

CDC

Комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) визначали шляхом вимірювання вмісту внутріклітинного АТФ в нелізованих клітинах після додавання людського комплементу до клітин-мішеней, які інкубуються з анти-CLDN6 антитілами. Для вимірювання АТФ використовували люмінесцентну реакцію люциферази, як дуже чутливий аналітичний метод.

Клітини CHO-K1, стабільно трансфіковані CLDN6 (CHO-K1-CLDN6), збирали за допомогою 0,05 % трипсин/EDTA, двічі промивали середовищем X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) і ресуспендували в концентрації 1×10^7 клітин/мл в середовищі X-Vivo 15. 250 мкл клітинної суспензії переносили в 0,4 см кювету для електропорації і змішували з 7 мкг in vitro транскрибованої РНК, яка кодує люциферазу (luciferase IVT RNA). Проводили електропорацію клітин при 200В і 300 мкФ за допомогою Gene Pulser Xcell (Bio Rad). Після електропорації клітини ресуспендували в 2,4 мл теплового середовища D-MEM/F12 (1:1) з GlutaMax-I (Invitrogen, 31331-093), яке містить 10 % (об./об.) FCS, 1 % (об./об.) пеніциліну/стрептоміцину і 1,5 міліграм/мл G418. Висіювали 50 мкл клітинної суспензії на комірку в прозорий 96-комірковий PP-планшет і інкубували при 37 °C і 7,5 % CO₂. Через 24 години після електропорації до клітин

додавали 50 мкл моноклональних мишачих анти-CLDN6 антитіл в 60 % RPMI (що містить 20 мМ HEPES) і 40 % людської сироватки (суміш сироваток, отримана від шести здорових донорів) у певних концентраціях. 10 мкл 8 % (об./об.) Тритону X-100 в PBS на комірку додали до контролів загального лізису, тоді як до контролів максимуму життєздатних клітин і до поточних зразків

додали 10 мл PBS на комірку. Після інкубації протягом 80 хвилин при 37 °C і 7,5 % CO₂ додали 50 мкл люциферинової суміші (3,84 міліграм/мл D-люциферину, 0,64 У/мл атфази і 160 мМ HEPES в ddH₂O) на комірку. Планшет інкубували в темноті протягом 45 хв. за кімнатної температури. Люмінесценцію вимірювали за допомогою люмінометра (Infinite M200, TECAN). Результати дані у вигляді інтегрованих чисельних відносних світлових одиниць (RLU).

Проводили електропорацію NEC8 клітин при 200В і 400 мкФ і культивували в RPMI 1640 в середовищі GLUTAMAX-I (Invitrogen, 61870), яке містить 10 % (об./об.) FCS.

Специфічний лізис обчислювали таким чином:

Специфічний лізис [%] = 100 - [(зразок — загальний лізис) / (максимум життєздатних клітин — загальний лізис) × 100]

максимум життєздатних клітин: 10 мкл PBS, без антитіл

загальний лізис: 10 мкл 8 % (об./об.) Тритон X-100 в PBS, без антитіл

Раннє лікування

Для раннього лікування антитілами 2×10^7 NEC8 клітин в 200 мкл PBS підшкірно інокулювали в бік безтімусних мишей Nude-Foxn1^{nu}. Кожна експериментальна група складалася з самок мишей 6-8 тижневого віку. Через три дні після інокуляції протягом 46 днів вводили 200 мкг очищених мишачих моноклональних антитіл muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A двічі на тиждень, почергово, за допомогою внутрішньовених і внутрішньоочеревинних ін'єкцій. Експериментальні групи, оброблені PBS, служили негативним контролем. Об'єм пухлин ($TV = (\text{довжина} \times \text{ширина}^2)/2$) вимірювали двічі на тиждень. TV виражався в мм³, що давало можливість побудувати криві зростання пухлини залежно від часу. Коли пухлина досягала об'єму більше ніж 1500 мм³, мишей забивали.

d. Результати

Мишачі моноклональні антитіла muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A показали сильне зв'язування з людським CLDN6 і CLDN6 SNP (одиначний нуклеотидний поліморфізм) варіантом I143V, але не спостерігалось зв'язування з CLDN3, 4 і 9 (Фіг. 6).

MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A показали дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 200-500 нг/мл), при цьому насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій (Фіг. 7).

MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A продемонстрували дозозалежну CDC-активність і викликали CDC за низьких концентрацій (Фіг. 8). Анти-CLDN6-антитіла muMAB 65A і 66B викликали CDC на клітинах NEC8 дозозалежним чином (Фіг. 9). Специфічність до мішені muMAB 65A і 66B поліпшувалася при використанні клітин NEC8 LVTS2 54 (CLDN6 нокаутні).

Крім того, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B і 67A показали інгібування зростання пухлини у мишей з прищепленими клітинами NEC8 (Фіг. 10).

Приклад 7. Отримання і тестування химерних моноклональних антитіл до CLDN6

а. Отримання мишиних/людських химерних моноклональних антитіл

Для химеризації варіабельну область мишачого важкого ланцюга і легкого ланцюга, включаючи лідерні послідовності, ампліфікували за допомогою ПЛР і праймерів, перерахованих в таблиці нижче. Мишачі важкі ланцюги об'єднували за допомогою сайту рестрикції APAl (5'-GGGCCC-3') з N-кінцевою частиною людського ланцюга Fсгамма1, який кодується вектором експресії. Варіабельні домени мишачого каппа ланцюга, включаючи лідерні послідовності, клонували попереду константної області з використанням сайту рестрикції BSIWI. Відповідну орієнтацію константної області у векторі, тобто відповідну для попереднього промотора вектора, підтвердили секвенуванням. Унаслідок положення сайту рестрикції APAl, будь-яка ампліфікація варіабельної області, включаючи лідерну послідовність, з цією метою повинна включати перші 11 нуклеотидів послідовності людської гамма-1 константної області на додачу до послідовності сайту APAl. Нуклеотидна послідовність людської константної області гамма-1 важкого ланцюга числиться як SEQ ID NO: 24, амінокислотна послідовність експресованої людської гамма-1 константної області числиться як SEQ ID NO: 25. Нуклеотидна послідовність, яка кодує константну частину каппа легкого ланцюга, числиться як SEQ ID NO: 26, відповідна амінокислотна послідовність числиться як SEQ ID NO: 27.

Таблиця 1. Мишачі лінії клітин гібридами, які використовувались для клонування антитіл

	muMAB	Ізотип	Праймер SEQ ID NO:
Важкий ланцюг	64A	IgG2a	17,18
	89A	IgG2a	17, 19
	61D	IgG2a	17,20
	67A	IgG2a	17,20
Легкий ланцюг	64A	IgK	21,22
	89A	IgK	21,23
	61D	IgK	21,22
	67A	IgK	21,22

Відповідно до мишачих аналогів химерні моноклональні антитіла називаються, наприклад, chimAB 64A, тобто додається префікс "chim".

Ампліфікація мишачих варіабельних областей легкого і важкого ланцюгів, включаючи лідерні послідовності, проводиться згідно методу "Step-out ПЛР" описаному в Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6). Для цього отримують загальну РНК з моноклональних гібридомних клітинних ліній (див. таблицю 1) стандартними способами, відомими фахівцям в даній галузі техніки, наприклад, з використанням набору RNeasy Mini Kit (Qiagen). Одноланцюгову кДНК отримують відповідно до методу "перемикання матриці (template-switch)" також описаному в Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6, 1558). На додачу до (dT) 30 олігомера (SEQ ID NO: 28), вона включала ДНК/РНК гібридний олігомер (SEQ ID NO: 29), який служить 5' адаптором перемикання матриці під час полімеризації нитки кДНК. У цьому адапторному олігомері останні три нуклеотиди були рибо- замість дезоксирибонуклеотидів. Подальша "Step-out ПЛР" використовувала антисмисловий олігомер, націлений на константну область мишачого каппа ланцюга або на константну область підкласу 2а гамма ланцюга (SEQ ID NO: 30 і 31, відповідно). Підклас IgG мишачих моноклональних антитіл, продукованих лінією клітин гібридами, був раніше імунологічно проаналізований за допомогою IsoStrip (Roche), і таким чином був вибраний відповідний антисмисловий олігомер (див. таблицю 1). Суміш праймерів служила як смисловий олігомер в "Step-out ПЛР", причому вона містила два олігомери, які відносяться до SEQ ID NO: 32 і 33.

Встановлені мишачі варіабельні області, включаючи лідерні послідовності, потім були ампліфіковані за допомогою ПЛР, не включаючи 5' UTR і 3' мишачу константну область, з додаванням сайтів рестрикції до кінців, які давали можливість субклонування в отримані вектори експресії, які несуть людські константні області. Крім того, смислові олігомери, які забезпечили консенсусну послідовність Козак (5'-GCCGCCACC-3') і антисмислових олігомерів для варіабельних областей важкого ланцюга, включали перші 11 нуклеотидів людською гамма-1 константної області на додачу до сайту рестрикції APAI (див. таблицю 1, SEQ ID NOs: 17 to 23). Варіабельні області каппа легкого ланцюга, включаючи лідерні послідовності, були клоновані за допомогою ферментів рестрикції HindIII і BSIWI, варіабельні області гамма важкого ланцюга вимагали HindIII і APAI ферменти рестрикції.

Крім того, були ампліфіковані мишачі варіабельні області легкого і важкого ланцюгів, включаючи лідерні послідовності, і були отримані додаткові химерні моноклональні антитіла до CLDN6 відповідно до протоколу, розкритого вище.

b. Отримання химерних моноклональних анти-CLDN6 антитіл

Химерні моноклональні антитіла тимчасово експресувались в клітинах HEK293T (ATCC CRL-11268), трансфікованих плазмідною ДНК, яка кодує легкий і важкий ланцюги відповідного антитіла. За 24 години до трансфекції 8 × 10 клітин висівали на 145 мм чашки для культивування клітин і культивували в 25 мл середовища HEK293T (DMEM/F12+GLUTAMAX-I, 10 % FCS, 1 % пеніцилін/стрептоміцин). 20 мкг плазмідної ДНК розчинили в 5 мл середовища HEK293T без добавок на чашку. Після додавання 75 мкл лінійного поліетиленіміну (PEI) (1 міліграм/мл) (Polyscience, 23966) (ДНК:PEI) -суміш інкубували 15 хвилин за кімнатної температури. Після цього до клітин краплями додавали суміш для трансфекції. Через 24 години після трансфекції HEK293T-середовище замінили Pro293a-середовищем (Lonza, BE12-764Q), яке містить 1 % пеніцилін/стрептоміцину. Для оптимальної експресії трансфіковані клітини культивували при 37 °C і 7,5 % CO₂ протягом додаткових 96-120 годин. Супернатант збирали, очищали химерні антитіла за допомогою FPLC, використовуючи білок-А-колонки. Концентрацію антитіл визначали за допомогою SDS-PAGE.

c. Тестування химерних моноклональних антитіл до CLDN6

Проточна цитометрія

Щоб перевірити специфічність і афінність зв'язування CLDN6-специфічних химерних моноклональних антитіл з клітинами HEK293, стабільно трансфікованими CLDN3, 4, 6 або 9, відповідно, лінії пухлинних клітин, які ендogenно експресують CLDN6, були досліджені за допомогою проточної цитометрії. Для цього клітини збирали 0,05 % трипсином/EDTA, промивали FACS-буфером (PBS, який містить 2 % FCS і 0,1 % азиду натрію) і ресуспендували в FACS-буфері за концентрації 2×10^6 клітин/мл. 100 мкл клітинної суспензії інкубували з відповідним антитілом за вказаних концентрацій протягом 60 хвилин при 4 °C. Химерне перехресно-реактивне антитіло (chimAB 5F2D2) використовували для визначення експресії CLDN6 і CLDN9. Комерційно доступні мишачі анти-клаудин антитіла анти-CLDN3 (R&D, MAB4620) і анти-CLDN4 (R&D, MAB4219) використовувались як позитивні контролю, тоді як людський IgG1-каппа (Sigma, 15154) служив негативним контролем. Клітини три рази промивали FACS-буфером і інкубували протягом 30 хвилин при 4 °C з APC-кон'югованим козином анти-людина IgG Fc-гамма (Dianova, 109-136-170) або APC-кон'югованими анти-миша IgG 1+2a+2b+3a (Dianova, 115-135-164) специфічними вторинними антитілами, відповідно. Клітини двічі промивали і ресуспендували в FACS-буфері. Зв'язування аналізували за допомогою проточної цитометрії, використовуючи BD FACSAarray.

CDC

Комплемент-залежну цитотоксичність (CDC) визначали шляхом вимірювання вмісту внутріклітинного АТФ в нелізованих клітинах після додавання людського комплементу до клітин-мішеней, що інкубуються з анти-CLDN6 антитілами. Для вимірювання АТФ використовували люмінесцентну реакцію люциферази, як дуже чутливий аналітичний метод.

У цьому дослідженні використовували клітини дикого типу NEC8 (CLDN6 позитивні) і NEC8 CLDN6-нокаутні клітини (CLDN6 негативні), котрі, як ті, так і інші, були стабільно трансдуковані конструктом експресії люциферази. Клітини збирали 0,05 % трипсином/EDTA і доводили до концентрації 2×10^5 клітин/мл в RPMI середовищем GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010), яке містить 10 % (об./об.) FCS. 1×10^4 клітин висівали в прозорі 96-коміркові PP-планшети та інкубували протягом 24 годин при 37 °C і 5 % CO₂. Після інкубації до клітин додали 50 мкл моноклональних химерних анти-CLDN6-антитіл в 60 % RPMI (що містить 20 мМ HEPES) і 40 % людської сироватки (суміш сироваток, отримана від шести здорових донорів) у певних концентраціях. 10 мкл 8 % (об./об.) Тритона X-100 в PBS на комірку додали до контролів загального лізису, тоді як до контролів максимуму життєздатних клітин і до поточних зразків додали 10 мл PBS на комірку. Після інкубації протягом 80 хвилин при 37 °C і 5 % CO₂ додали 50 мкл люциферинової суміші (3,84 міліграм/мл D-люциферину, 0,64 U/мл атфази і 160 мМ HEPES в ddH₂O) на комірку. Планшет інкубували в темноті протягом 45 хв. за кімнатної температури. Люмінесценцію вимірювали за допомогою люмінометра (Infinite M200, TECAN). Результати подані у вигляді інтегрованих чисельних відносних світлових одиниць (RLU).

Специфічний лізис обчислювали таким чином:

Специфічний лізис[%] = $100 - \frac{(\text{зразок} - \text{загальний лізис})}{(\text{максимум життєздатних клітин} - \text{загальний лізис})} \times 100$

максимум життєздатних клітин: 10 мкл PBS, без антитіл

загальний лізис: 10 мкл 8 % (об./об.) Тритон X-100 в PBS, без антитіл

ADCC

Антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) визначали шляхом вимірювання вмісту внутрішньоклітинного АТФ в нелізованих клітинах після додавання людського PBMC до клітин-мішеней, які інкубуються з анти-CLDN6 антитілами. Для вимірювання АТФ використовували люмінесцентну реакцію люциферази, як дуже чутливий аналітичний метод.

У цьому дослідженні використовували клітини дикого типу NEC8 (CLDN6 позитивні) і NEC8 CLDN6-нокаутні клітини (CLDN6 негативні), які, як ті, так і інші, були стабільно трансдуковані конструктом експресії люциферази. Клітини збирали 0,05 % трипсином/EDTA і доводили до концентрації 2×10^5 клітин/мл в RPMI середовищем GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010), яке містить 10 % (об./об.) FCS і 20 мМ Hepes. 1×10^4 клітин висівали в прозорі 96-коміркові PP-планшети і інкубували 4 години при 37 °C і 5 % CO₂.

PBMC (мононуклеарні клітини периферичної крові) виділяли із зразків людської донорської крові центрифугуванням в градієнті щільності з використанням Ficoll Nupaque (GE Healthcare, 17144003). Були виділені PMBC, як містять інтерфазу, клітини двічі промивали PBS/EDTA (2 мМ). 1×10^8 PBMC висівали в 50 мл середовища X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q), що містить 5 % інактивованої нагріванням людської сироватки (Lonza, US14-402E), та інкубували протягом 2 годин при 37 °C і 5 % CO₂.

Через 4 години після висівання клітин-мішеней (NEC-8) до клітин додавали 25 мкл моноклональних химерних анти-CLDN6 антитіл в PBS у вказаних концентраціях. Неприкріплені

PBMC, які відокремилися від прикріплених моноцитів протягом 2 годин інкубації, зібрали і відрегулювали концентрацію до 8×10^6 клітин/мл в середовищі X-vivo 15. 25 мкл цієї клітинної суспензії додали до клітин-мішеней і моноклональних химерних анти-CLDN6 антитіл. Планшети інкубували протягом 24 годин при 37 °C і 5 % CO₂.

Через 24 години інкубації 10 мкл 8 % (об./об.) Тритона X-100 в PBS на комірку додали до контролів загального лізису, тоді як до контролів максимуму життєздатних клітин і до поточних зразків додали 10 мл PBS на комірку. Додали 50 мкл люциферинової суміші (3,84 міліграм/мл D-люциферину, 0,64 U/мл атфази і 160 mM HEPES в ddH₂O) на комірку. Планшет інкубували в темноті протягом 30 хв. за кімнатної температури. Біоломінесценцію вимірювали за допомогою люмінометра (Infinite M200, TECAN). Результати дані у вигляді інтегрованих чисельних відносних світлових одиниць (RLU).

Специфічний лізис обчислювали таким чином:

Специфічний лізис [%] = $100 - [(зразок - загальний лізис) / (максимум життєздатних клітин - загальний лізис) \times 100]$

максимум життєздатних клітин: 10 мкл PBS, без антитіл
загальний лізис: 10 мкл 8 % (об./об.) Тритон X-100 в PBS, без антитіл
d. Результати

Анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 61D, 64A, 67A і 89A показали сильне зв'язування з людським CLDN6, тоді як зв'язування з CLDN3, 4 і 9 не спостерігалось (Фіг. 11).

Що стосується зв'язування з людським CLDN6, стабільно експресованим на поверхні клітин HEK293, анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 64A і 89A продемонстрували дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 450-600 нг/мл) і насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій. ChimAB 67A і 61D показали низьке (EC₅₀ 1000 нг/мл) і середнє (EC₅₀ 2300 нг/мл) значення EC₅₀, відповідно (Фіг. 12).

Що стосується зв'язування з CLDN6, ендогенно експресованим на клітинах NEC8, анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 64A і 89A продемонстрували дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 600-650 нг/мл), причому насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій, тоді як chimAB 61D і 67A показали середнє (EC₅₀ 1700 нг/мл) і високе (EC₅₀ 6100 нг/мл) значення EC₅₀, відповідно (Фіг. 13).

Що стосується зв'язування з CLDN6, ендогенно експресованим на клітинах OV90, анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 64A і 89A продемонстрували дуже низькі значення EC₅₀ (EC₅₀ 550-600 нг/мл), а насичення зв'язування досягалося за низьких концентрацій. CHIMAB 61D і 67A показали середні значення EC₅₀ (EC₅₀ 1500 нг/мл і EC₅₀ 2300 нг/мл, відповідно) (Фіг. 14).

Анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 61D, 64A, 67A і 89A продемонстрували дозозалежну CDC-активність на клітинах NEC-8 (Фіг. 15).

Анти-CLDN6 химерні моноклональні антитіла chimAB 61D, 64A, 67A і 89A продемонстрували дозозалежну ADCC-активність на клітинах NEC-8 і викликали ADCC навіть за низьких концентрацій антитіл (Фіг. 16).

Ці результати демонструють специфічність цих химерних моноклональних антитіл до CLDN6.

Приклад 8. Лікування за допомогою моноклональних антитіл до CLDN6

Раннє лікування

Для дослідження раннього лікування антитілами 2×10^7 NEC8 клітин в 200 мкл PBS (Gibco) підшкірно інокулювали в бік безтімусних мишей Nude-Foxn1^{nu}. Кожна експериментальна група складалася з самок мишей 6-8 тижневого віку. Через три дні після інокуляції протягом семи тижнів вводили 200 мкг очищених мишачих моноклональних антитіл muMAB 89A двічі на тиждень, почергово, шляхом внутрішньовенних і внутрішньоочеревинних ін'єкцій. Експериментальна група, оброблена PBS, служила негативним контролем. Об'єм пухлини (TV = (довжина × ширина²)/2) вимірювали двічі на тиждень. TV виражався в мм³, що давало можливість побудувати криві зростання пухлини залежно від часу. Коли пухлина досягала об'єму більше ніж 1500 мм³, мишей забивали.

Лікування на прогресуючій стадії

Для лікування за допомогою антитіл розвинених ксенотрансплантатів пухлин 2×10^7 клітин NEC8 в 200 мкл середовища RPMI (Gibco) підшкірно інокулювали в бік самок безтімусних мишей Nude-Foxn1^{nu} 6-8 тижневого віку. Об'єм пухлини (TV = (довжина × ширина²)/2) вимірювали двічі на тиждень. TV виражався в мм³, що давало можливість побудувати криві зростання пухлини залежно від часу. Через 15 – 17 днів після інокуляції клітин пухлини мишей розділили на лікувальні групи по вісім тварин в групі з однорідними розмірами пухлин вище 80 мм³. 200 мкг очищених мишачих моноклональних антитіл muMAB 61D, 64A, 67A і 89A

застосовували протягом п'яти тижнів, чергуючи внутрішньовенні і внутрішньоочеревинні ін'єкції, двічі на тиждень. Експериментальні групи, оброблені PBS і неспецифічними антитілами, служили негативними контролями. Коли пухлини досягали об'єму більше ніж 1500 мм³, мишей забивали.

5 На мишачій моделі ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8 було показано, що при ранньому лікуванні мишачими моноклональними антитілами muMAb 61D, 64A і 67A, не спостерігалось якого-небудь зростання пухлини у мишей навіть після припинення імунотерапії (Фіг. 17).

10 На мишачій моделі ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8 було показано, що раннє лікування muMAb 89A викликає інгібування зростання пухлини, при цьому у мишей, яких лікували muMAb89A, в кінці дослідження пухлина не була виявлена (Фіг. 18).

15 При лікуванні на прогресуючій стадії мишачого ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8, muMAb 64A продемонстрували інгібування зростання пухлини (Фіг. 19).

При лікуванні на прогресуючій стадії мишачого ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8, у мишей, яких лікували muMAb 64A, спостерігалось збільшення тривалості життя (Фіг. 20).

20 При лікуванні на прогресуючій стадії мишачого ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8, інгібування зростання пухлини досягалось за допомогою мишачих моноклональних анти-CLDN6 антитіл muMAb 61D, 67A і 89A (Фіг. 21).

При лікуванні на прогресуючій стадії мишачого ксенотрансплантату пухлини, прищепленого лінією пухлинних клітин NEC8, у мишей, яких лікували CLDN6-специфічними антитілами muMAb 61D або 67A, спостерігалось збільшення тривалості життя (Фіг. 22).

25 При лікуванні на прогресуючій стадії мишачого ксенотрансплантату пухлини, прищепленого клітинами NEC8 дикого типу і клітинами NEC8 із стабільним нокаутним CLDN6, muMAb 64A і 89A показали терапевтичний ефект тільки на мишах, прищеплених клітинами NEC8 дикого типу, але не у мишей, прищеплених NEC8 CLDN6-нокаутними клітинами, що показує CLDN6-специфічність антитіл *in vivo* (Фіг. 23).

30 Приклад 9. Високодозвільне картування епітопів моноклональних антитіл до CLDN6

CLDN6 специфічні моноклональні антитіла показали тільки дуже слабке (за його наявності) зв'язування з лінійними пептидами в ELISA-дослідженні картування епітопів, маючи на увазі що їх епітопи є конформаційними. Щоб проаналізувати взаємодію між антитілами, описаними тут, і CLDN6 в його нативній конформації як метод картування епітопів використовували сайтнаправлений мутагенез на культурі клітин ссавців. Був проведений аланін-скануючий мутагенез амінокислот 27-81 і 137-161 в першому і другому позаклітинному домені, відповідно. Після транзиторної експресії в клітинах HEK293T, мутанти CLDN6 були оцінені за їх здатністю зв'язуватися із специфічними моноклональними антитілами. Зменшене зв'язування специфічних моноклональних антитіл з CLDN6-мутантом означає, що амінокислота, яка мутує, є важливим зв'язуючим і/або конформаційним залишком. Зв'язування проаналізували за допомогою проточної цитометрії. Для того, щоб розрізнити трансфіковані і нетрансфіковані клітинні популяції, клітини ко-трансфікували флуоресцентним маркером.

Амінокислотні залишки CLDN6, які є важливими для взаємодії з CLDN6-специфічними химерними антитілами, були методично встановлені за допомогою сканування аланіном. Мутації аланіну і гліцину були викликані за допомогою сайтнаправленого мутагенезу (GENEART AG, Німеччина). Щоб перевірити зв'язування моноклональних химерних антитіл з CLDN6 дикого типу і його мутантами, клітини HEK293T були транзиторно трансфіковані відповідною клаудин-кодуючою плазмідною, а експресію аналізували за допомогою проточної цитометрії. Для того, щоб розрізнити трансфіковані і нетрансфіковані клітини HEK293T клітини як репортером ко-трансфікували флуоресцентним маркером. Через 24 години після трансфекції клітини зібрали 0,05 % трипсином/EDTA; промили FACS-буфером (PBS, що містить 2 % PCS і 0,1 % азид натрію) і ресуспендували в FACS-буфері при концентрації 2×10^6 клітин/мл. 100 мкл клітинної суспензії інкубували з 10 мкг/мл антитіл протягом 45 хвилин при 4 °C. Комерційно доступні мишачі анти-CLDN6 (R&D, MAB3656) використовували як контроль для визначення експресії на клітинній поверхні мутантів CLDN6. Клітини три рази промивали FACS-буфером і інкубували з APC-кон'югованим козином анти-людина IgG Fc-гамма (Dianova, 109-136-170) або APC-кон'югованим анти-мишачим IgG I+2a+2b+3a специфічним вторинним антитілом (Dianova, 115-135-164) протягом 30 хвилин при 4 °C. Клітини промивали двічі і ресуспендували в FACS-буфері. Зв'язування з трансфікованою клітинною популяцією аналізували за допомогою проточної цитометрії з використанням BD FACSArray. Відповідно, експресію флуоресцентного маркера

наносили на графік по осі абсцис відносно зв'язування антитіл по осі ординат. Середня інтенсивність сигналу зв'язування моноклонального химерного антитіла CLDN6-специфічного з мутантом CLDN6 була виражена у вигляді відсотка від зв'язування з диким типом. Амінокислоти, необхідні для зв'язування, не показали зв'язування після мутації, тоді як

5 амінокислоти, які підтримують зв'язування, показали тільки зменшене зв'язування у порівнянні з диким типом.

Картування епітопів з високим розрізненням показало, що амінокислоти F35, G37, S39 і можливо T33 першого позаклітинного домена CLDN6 є важливими для взаємодії з CLDN6-специфічними химерними антитілами chimAB 61D, 64A, 67A і 89A. Залишок 140 є необхідним

10 для зв'язування chimAB 89A, і він сприяє скріпленню chimAB 61D і 67A. Крім того, L151 другого позаклітинного домена CLDN6 є важливим для взаємодії з chimAB 67A (Фіг. 24).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ГАНІМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ АГ та ін.

<120> Антитіла для лікування раку

<130> 342-52 PCT

<150> EP 09 014 136.7

<151> 2009-11-11

<150> EP 10 006 956.6

<151> 2010-07-06

<150> US 61/361,618

<151> 2010-07-06

<150> US 61/260,202

<151> 2009-11-11

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1369

<212> ДНК

<213> Людина

<400> 1

```

cgacactcgg cctaggaatt tcccttatct ccttcgcagt gcagctcctt caacctcgcc      60
atggcctctg ccggaatgca gactctggga gtcgtctga cactgctggg ctgggtgaat      120
ggcctgggtct cctgtgcctt gcccatgtgg aagggtgaccg ctttcacgga caacagcatc      180
gtgggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtgggtgca gagcaccggc      240
cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca      300
cgtgccctct gtgtcatcgc cctcctgtgt gccctgttgg gcttgctggg ctaccttget      360
ggggccaagt gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca agggccgctt ggtgctcacc      420
tctgggattg tctttgtcat ctacggggtc ctgacgctaa tcccctgtgt ctggacggcg      480
catgccatca tccgggaactt ctataacccc ctggtggctg agggccaaaa gcgggagctg      540
ggggcctccc tctacttggg ctggggcgcc tcaggccttt tgttgctggg tgggggggtg      600
ctgtgctgca cttgcccttc ggggggggtcc cagggcccca gccattacat ggcccgctac      660
tcaacatctg cccctgccat ctctcggggg cctctgagt acctaccaa gaattacgtc      720
tgacgtggag ggggaatggg gctccgctgg cgctagagcc atccagaagt ggcagtgcc      780
aacagctttg ggatgggttc gtaccttttg tttctgcttc ctgctatttt tcttttgact      840
gaggatattt aaaattcatt tgaaaactga gccaaaggtg tgactcagac tctacttag      900
gtctgtctgt ttctacccct tggatgatgg agccaaagag gggatgcttt gagattctgg      960
atcttgacat gcccatctta gaagccagtc aagctatgga actaatgcgg aggctgcttg      1020

```

342-52PCT seq_ST25.txt
 ctgtgctggc ttgcaacaa gacagactgt ccccaagagt tctgctgct gctgggggct 1080
 gggcttccct agatgtcact ggacagctgc ccccatcct actcaggtct ctggagctcc 1140
 tctcttcacc cctggaaaaa caaatgatct gttaacaaag gactgcccac ctccggaact 1200
 tetgacctct gtttctcccg tctgataag acgtccaccc ccagggcca ggtccagct 1260
 atgtagaccc cggccccac ctccaacact gcaccttct gcctgcccc cctcgtctca 1320
 cccctttac actcacattt ttatcaaata aagcatgttt tgtagtgc 1369

<210> 2
 <211> 220
 <212> ФРТ
 <213> Людина
 <400> 2

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
 20 25 30
 Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
 35 40 45
 Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
 50 55 60
 Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
 85 90 95
 Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
 100 105 110
 Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
 115 120 125
 Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
 130 135 140
 Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
 145 150 155 160
 Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
 165 170 175

342-52PCT seq_ST25.txt
 Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
 180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
 195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
 210 215 220

<210> 3
 <211> 805
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> кодон-оптимізована нуклеотидна послідовність, яка кодує людський клаудин 6

<400> 3
 caagcgcgtc aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct gttaattaac taaggtacca 60
 agcttgccac catggccagc gccggcatgc agatcctggg agtgggtgctg accctgctgg 120
 gctgggtgaa cggcctgggtg tcttgccccc tgcccatgtg gaaagtgacc gccttcacgc 180
 gcaacagcat cgtgggtggc caggtcgtgt gggagggcct gtggatgagc tgtgtgggtgc 240
 agagcaccgg ccagatgcag tgcaagggtg acgacagcct gctggccctg cctcaggatc 300
 tgcaggccgc cagagccctg tgtgtgatcg ccctgctggg cgcctgttc ggcctgctgg 360
 tgtacctgc tggcgccaag tgcaccacct gtgtggagga aaaggacagc aaggcccgcc 420
 tggctctgac aagcggcatc gtgttcgtga tcagcggcgt gctgacactg atccccgtgt 480
 gctggaccgc ccacgccatc atccgggaact tctacaacct tctgggtggc gaggccaga 540
 agagagagct gggcgccagc ctgtatctgg gatggggcgc ctccaggactg ctgctgctgg 600
 gcggaggcct gctgtgctgt acatgtccta gggcgggctc ccagggccct agccactaca 660
 tggcccggtg cagcaccagc gcccctgcca tcagcagagg cccagcagag taccaccacca 720
 agaactacgt gtgataggaa ttcgagctct tatggcgccg ccaattcgcc ctatagttag 780
 tcgtattacg tcgcgctcac tggcc 805

<210> 4
 <211> 165
 <212> ДНК
 <213> Штучна

<220>
 <223> кодон-оптимізована нуклеотидна послідовність, яка кодує дві очікувані
 позаклітинні петлі (EC2) людського клаудину 6

<400> 4
 ggcgcgcca ggtaccaagc ttgccaccat ggaaccgac accctgctgc tgtgggtgct 60
 gctcctgtgg gtcccaggct ctacaggcga cgcgcgccag cccagagact tctacaacct 120

342-52PCT seq_ST25.txt
cctgggtggcc gaggcccaga agctcgagtc tagagggtta attaa 165

<210> 5
<211> 38
<212> ФРТ
<213> Штучна

<220>
<223> очікувані 2 позаклітинні петлі людського клаудину 6, які містять Ig каппа лідерну послідовність

<220>
<221> SIGNAL
<222> (1) .. (21)
<223> Ig каппа лідерна послідовність

<220>
<221> DOMAIN
<222> (26) .. (38)
<223> очікувані 2 позаклітинні петлі (EC2) людського клаудину 6

<400> 5

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu
20 25 30

Val Ala Glu Ala Gln Lys
35

<210> 6
<211> 13
<212> ФРТ
<213> Людина

<400> 6

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys
1 5 10

<210> 7
<211> 53
<212> ФРТ
<213> Людина

<400> 7

Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala
1 5 10 15

Gln Val Val Trp Glu Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr
20 25 30

Gly Gln Met Gln Cys Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln

342-52PCT seq_ST25.txt

35 40 45

Asp Leu Gln Ala Ala
50

<210> 8
<211> 220
<212> ФРҮ
<213> Людина

<220>
<221> VARIANT
<222> (143)..(143)
<223> людський клаудин 6 I143V поліморфізм
<400> 8

Met Ala Ser Ala Gly Met Gln Ile Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu
1 5 10 15

Gly Trp Val Asn Gly Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Met Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Phe Gly Leu Leu
85 90 95

Val Tyr Leu Ala Gly Ala Lys Cys Thr Thr Cys Val Glu Glu Lys Asp
100 105 110

Ser Lys Ala Arg Leu Val Leu Thr Ser Gly Ile Val Phe Val Ile Ser
115 120 125

Gly Val Leu Thr Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Val Ile
130 135 140

Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
165 170 175

342-52PCT seq_ST25.txt

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Ser Gly Gly Ser Gln Gly
180 185 190

Pro Ser His Tyr Met Ala Arg Tyr Ser Thr Ser Ala Pro Ala Ile Ser
195 200 205

Arg Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Thr Lys Asn Tyr Val
210 215 220

<210> 9
<211> 217
<212> ФРГ
<213> Людина
<400> 9

Met Ala Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Val Leu
1 5 10 15

Gly Trp Leu Gly Thr Leu Val Ser Cys Ala Leu Pro Leu Trp Lys Val
20 25 30

Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu
35 40 45

Gly Leu Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
50 55 60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ala Leu Cys Val Ile Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Leu
85 90 95

Val Ala Ile Thr Gly Ala Gln Cys Thr Thr Cys Val Glu Asp Glu Gly
100 105 110

Ala Lys Ala Arg Ile Val Leu Thr Ala Gly Val Ile Leu Leu Leu Ala
115 120 125

Gly Ile Leu Val Leu Ile Pro Val Cys Trp Thr Ala His Ala Ile Ile
130 135 140

Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Leu Lys Arg Glu Leu
145 150 155 160

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Leu Met Leu
165 170 175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg
Page 6

342-52PCT seq_ST25.txt

```

180                               185                               190

Pro Arg Gly Pro Arg Leu Gly Tyr Ser Ile Pro Ser Arg Ser Gly Ala
 195                               200                               205

Ser Gly Leu Asp Lys Arg Asp Tyr Val
 210                               215

<210> 10
<211> 209
<212> ФРГ
<213> Людина
<400> 10

Met Ala Ser Met Gly Leu Gln Val Met Gly Ile Ala Leu Ala Val Leu
 1                               5                               10                               15

Gly Trp Leu Ala Val Met Leu Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val
 20                               25                               30

Thr Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Val Thr Ser Gln Thr Ile Trp Glu
 35                               40                               45

Gly Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys
 50                               55                               60

Lys Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala
 65                               70                               75                               80

Arg Ala Leu Val Ile Ile Ser Ile Ile Val Ala Ala Leu Gly Val Leu
 85                               90                               95

Leu Ser Val Val Gly Gly Lys Cys Thr Asn Cys Leu Glu Asp Glu Ser
 100                              105                              110

Ala Lys Ala Lys Thr Met Ile Val Ala Gly Val Val Phe Leu Leu Ala
 115                              120                              125

Gly Leu Met Val Ile Val Pro Val Ser Trp Thr Ala His Asn Ile Ile
 130                              135                              140

Gln Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Ser Gly Gln Lys Arg Glu Met
 145                              150                              155                              160

Gly Ala Ser Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu
 165                              170                              175

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Asn Cys Pro Pro Arg Thr Asp Lys Pro
 180                              185                              190

```

342-52PCT seq_ST25.txt

Tyr Ser Ala Lys Tyr Ser Ala Ala Arg Ser Ala Ala Ala Ser Asn Tyr
195 200 205

Val

<210> 11
<211> 220
<212> ФРГ
<213> Людина
<400> 11

Met Ser Met Gly Leu Glu Ile Thr Gly Thr Ala Leu Ala Val Leu Gly
1 5 10 15

Trp Leu Gly Thr Ile Val Cys Cys Ala Leu Pro Met Trp Arg Val Ser
20 25 30

Ala Phe Ile Gly Ser Asn Ile Ile Thr Ser Gln Asn Ile Trp Glu Gly
35 40 45

Leu Trp Met Asn Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys
50 55 60

Val Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Arg
65 70 75 80

Ala Leu Ile Val Val Ala Ile Leu Leu Ala Ala Phe Gly Leu Leu Val
85 90 95

Ala Leu Val Gly Ala Gln Cys Thr Asn Cys Val Gln Asp Asp Thr Ala
100 105 110

Lys Ala Lys Ile Thr Ile Val Ala Gly Val Leu Phe Leu Leu Ala Ala
115 120 125

Leu Leu Thr Leu Val Pro Val Ser Trp Ser Ala Asn Thr Ile Ile Arg
130 135 140

Asp Phe Tyr Asn Pro Val Val Pro Glu Ala Gln Lys Arg Glu Met Gly
145 150 155 160

Ala Gly Leu Tyr Val Gly Trp Ala Ala Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly
165 170 175

Gly Ala Leu Leu Cys Cys Ser Cys Pro Pro Arg Glu Lys Lys Tyr Thr
180 185 190

342-52PCT seq_ST25.txt

Ala Thr Lys Val Val Tyr Ser Ala Pro Arg Ser Thr Gly Pro Gly Ala
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gly Tyr Asp Arg Lys Asp Tyr Val
 210 215 220

<210> 12

<211> 159

<212>

<213> ДНК

Штучна

<220>

<223> кодон-оптимізована нуклеотидна послідовність, яка кодує одну очікувану позаклітинну петлю (EC1) людського клаудину 6

<400> 12

cccatgtgga aagtgaccgc cttcatcggc aacagcatcg tggtagccca ggtggtctgg 60

gagggcctgt ggatgagctg cgtgggtgcag agcacgggcc agatgcagtg caaggtgtac 120

gacagcctgc tggcctgcc tcaggatctg caggctgct 159

<210> 13

<211> 106

<212> ФРТ

<213> Штучна

<220>

<223> очікувана 1 позаклітинна петля людського клаудину 6, яка містить Ig каппа лідерну послідовність

<220>

<221> Signal

<222> (1)..(21)

<223> Ig каппа лідерна послідовність

<220>

<221> Domain

<222> (26)..(78)

<223> очікувана 1 позаклітинна петля (EC1) людського клаудину 6

<400> 13

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Pro Met Trp Lys Val Thr Ala
 20 25 30

Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu Gly Leu
 35 40 45

Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys Val
 50 55 60

342-52PCT seq_ST25.txt

Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Leu Glu
65 70 75 80

Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
85 90 95

Met His Thr Gly His His His His His His
100 105

<210> 14
<211> 13
<212> ФРТ
<213> Людина
<400> 14

Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile
1 5 10

<210> 15
<211> 15
<212> ФРТ
<213> Людина
<400> 15

Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala
1 5 10 15

<210> 16
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна
<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 16
tccatgacgt tectgacgtt

20

<210> 17
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 17
gagaaagctt gccgcacca tgggatggag ctggatcttt ctc

43

<210> 18
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>

342-52PCT seq_ST25.txt

```

<223> Олігонуклеотиди
<400> 18
gagagggccc ttggtggagg ctgaagagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 19
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 19
gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 20
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 20
gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 21
<211> 46
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 21
gagaaagctt gccgccacca tgcattttca agtgcagatt ttcagc 46

<210> 22
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 22
cacacgtacg ttgatttcc agcttggtgc etc 33

<210> 23
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди
<400> 23
cacacgtacg ttgatttcc agcttggtgc etc 33

```

Page 11

342-52PCT seq_ST25.txt

<210> 24
 <211> 993
 <212> ДНК
 <213> Людина
 <400> 24
 gcctccacca agggcccaag cgtgttcccc ctggcccccga gcagcaagag caccagcggc 60
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 120
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 180
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 300
 aagagctgcg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag cccagagct gctgggcgga 360
 cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 420
 gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 540
 agcacctaca ggggtggtgt cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 600
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc 660
 aaggccaagg gccagccaag ggagccccag gtgtacaccc tgccccccag ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 840
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960
 cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag tag 993

<210> 25
 <211> 330
 <212> ФРТ
 <213> Людина

<400> 25

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

342-52PCT seq_ST25.txt

```

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                               70                               75                               80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85                               90                               95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100                             105                             110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115                             120                             125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130                             135                             140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                             150                             155                             160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165                             170                             175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180                             185                             190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195                             200                             205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210                             215                             220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                             230                             235                             240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245                             250                             255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260                             265                             270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275                             280                             285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290                             295                             300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                             310                             315                             320

```

342-52PCT seq_ST25.txt

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 26
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Людина
 <400> 26
 cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca ggcacgagca gctgaagtc 60
 ggcaccgcca gcggtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120
 tggaagggtgg acaacgcctt gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
 agcttcaaca ggggcgagtg ctag 324

<210> 27
 <211> 107
 <212> ФРТ
 <213> Людина
 <400> 27

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 28
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

342-52PCT seq_ST25.txt

```

<220>
<223> Олігонуклеотиди

<220>
<221> різні функції
<222> (31) .. (32)
<223> певний (будь-який) нуклеотид

<400> 28
ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt nn 32

<210> 29
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди

<400> 29
aagcagtggt atcaacgcag agtacgcggg 30

<210> 30
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди

<400> 30
ctgctcactg gatggtggga agatgg 26

<210> 31
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди

<400> 31
acaggggcca gtggatagac cgatg 25

<210> 32
<211> 45
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Олігонуклеотиди

<400> 32
gtaatagcag tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 33
<211> 22

```

342-52PCT seq_ST25.txt

<212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Олігонуклеотиди

<400> 33
 gtaataacgac tcactatagg gc

22

<210> 34
 <211> 117
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VH антитіла

<400> 34

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 107
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Послідовність VL антитіла

<400> 35

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

342-52PCT seq_ST25.txt

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Leu
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Val Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ile Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 117

<212> ФРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VH антитіла

<400> 36

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

342-52PCT seq_ST25.txt

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 107
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність VI антибіла

<400> 37

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 117
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність VII антибіла

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

342-52PCT seq_ST25.txt

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Phe Gly Tyr Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 107
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність VI антибіота

<400> 39

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 40
<211> 117
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність
<220>

342-52PCT seq_ST25.txt

<223> Послідовність VH антитіла

<400> 40

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41

<211> 107

<212> ФРГ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VL антитіла

<400> 41

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 20 25 30

His Trp Phe Gln Leu Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

342-52PCT seq_ST25.txt

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Tyr Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 42
<211> 5
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність VH CDR3 антитіла

<220>
<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
<222> (1) . . (1)
<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe
або Tyr, ще краще Tyr

<220>
<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
<222> (3) . . (3)
<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe
або Tyr, ще краще Tyr

<220>
<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
<222> (5) . . (5)
<223> Певна амінокислота, бажано Leu або Phe, краще Leu

<400> 42

Xaa Gly Xaa Val Xaa
1 5

<210> 43
<211> 6
<212> ФРТ
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність VH CDR3 антитіла

<220>
<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
<222> (2) . . (2)
<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe
або Tyr, ще краще Tyr

<220>
<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
<222> (4) . . (4)
<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe
або Tyr, ще краще Tyr

<220>

342-52PCT seq_ST25.txt

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (6) .. (6)

<223> Певна амінокислота, бажано Leu або Phe, краще Leu

<400> 43

Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa

1 5

<210> 44

<211> 6

<212> ФРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VH CDR3 антитіла

<220> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<221>

<222> (1) .. (1)

<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (3) .. (3)

<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (5) .. (5)

<223> Певна амінокислота, бажано Leu або Phe, краще Leu

<400> 44

Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp

1 5

<210> 45

<211> 7

<212> ФРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VH CDR3 антитіла

<220> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<221>

<222> (2) .. (2)

<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (4) .. (4)

<223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr

<220>

342-52PCT seq_ST25.txt
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (6) . . (6)
 <223> Певна амінокислота, бажано Leu або Phe, краще Leu
 <400> 45

Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp
 1 5

<210> 46
 <211> 10
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VH CDR3 антитіла

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (4) . . (4)
 <223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr
 <220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (6) . . (6)
 <223> Певна амінокислота, бажано ароматична амінокислота, краще Phe або Tyr, ще краще Tyr
 <220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (8) . . (8)
 <223> Певна амінокислота, бажано Leu або Phe, краще Leu
 <400> 46

Ala Arg Asp Xaa Gly Xaa Val Xaa Asp Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 8
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VH CDR1 антитіла
 <400> 47

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 8
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VH CDR2 антитіла

342-52PCT seq_ST25.txt

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (8) .. (8)
 <223> Певна амінокислота, бажано Thr, Ser або Ile, краще Thr
 <400> 48

Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VL CDR3 антитіла

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (2) .. (2)
 <223> Певна амінокислота, бажано Ser або Asn, краще Ser

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (3) .. (3)
 <223> Певна амінокислота, бажано Tyr, Ser, Ile, Asn або Thr, краще Tyr, Ser або Asn, ще краще Asn

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (4) .. (4)
 <223> Певна амінокислота, бажано Ser або Tyr, краще Tyr
 <400> 49

Arg Xaa Xaa Xaa Pro
 1 5

<210> 50
 <211> 7
 <212> ФРТ
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Послідовність VL CDR3 антитіла

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (3) .. (3)
 <223> Певна амінокислота, бажано Ser або Asn, краще Ser

<220>
 <221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ
 <222> (4) .. (4)
 <223> Певна амінокислота, бажано Tyr, Ser, Ile, Asn або Thr, краще Tyr, Ser або Asn, ще краще Asn
 <220>

342-52PCT seq_ST25.txt

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (5) . . (5)

<223> Певна амінокислота, бажано Ser або Tyr, краще Tyr

<400> 50

Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro

1 5

<210> 51

<211> 10

<212> ФРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VL CDR3 антитіла

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (4) . . (4)

<223> Певна амінокислота, бажано Ser або Asn, краще Ser

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (5) . . (5)

<223> Певна амінокислота, бажано Tyr, Ser, Ile, Asn або Thr, краще Tyr, Ser або Asn, ще краще Asn

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (6) . . (6)

<223> Певна амінокислота, бажано Ser або Tyr, краще Tyr

<400> 51

Gln Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 52

<211> 5

<212> ФРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VL CDR1 антитіла

<220>

<221> РІЗНІ ФУНКЦІЇ

<222> (4) . . (4)

<223> Певна амінокислота, бажано Ser або Asn, краще Ser

<400> 52

Ser Ser Val Xaa Tyr

1 5

<210> 53

<211> 3

<212> ФРТ

342-52PCT seq_ST25.txt

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність VL CDR2 антитіла

<400> 53

Ser Thr Ser

1

Page 26

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Моноклональне антитіло, яке зв'язується з CLDN6, де антитіло містить набір легких ланцюгів антитіла (LCDRs) і набір важких ланцюгів антитіла (HCDRs), які вибрані з групи, що містить:
 - (a) HCDR1 амінокислотної послідовності GYSFTGYT, визначеної SEQ ID NO: 34, HCDR2 амінокислотної послідовності INPYNGGT, визначеної SEQ ID NO: 34, HCDR3 амінокислотної послідовності ARDYGYVLDY, визначеної SEQ ID NO: 34,
 - 10 LCDR1 амінокислотної послідовності SSVSY, визначеної SEQ ID NO: 35, LCDR2 амінокислотної послідовності STS, визначеної SEQ ID NO: 35, LCDR3 амінокислотної послідовності QQRSIYPPWT, визначеної SEQ ID NO: 35;
 - (b) HCDR1 амінокислотної послідовності GYSFTGYT, визначеної SEQ ID NO: 36, HCDR2 амінокислотної послідовності INPYNGGT, визначеної SEQ ID NO: 36,
 - 15 HCDR3 амінокислотної послідовності ARDYGYVLDY, визначеної SEQ ID NO: 36, LCDR1 амінокислотної послідовності SSVSY, визначеної SEQ ID NO: 37, LCDR2 амінокислотної послідовності STS, визначеної SEQ ID NO: 37, LCDR3 амінокислотної послідовності QQRSIYPPWT, визначеної SEQ ID NO: 37;
 - (c) HCDR1 амінокислотної послідовності GYSFTGYT, визначеної SEQ ID NO: 38,
 - 20 HCDR2 амінокислотної послідовності INPYNGGT, визначеної SEQ ID NO: 38, HCDR3 амінокислотної послідовності ARDYGYVLDY, визначеної SEQ ID NO: 38, LCDR1 амінокислотної послідовності SSVSY, визначеної SEQ ID NO: 39, LCDR2 амінокислотної послідовності STS, визначеної SEQ ID NO: 39, LCDR3 амінокислотної послідовності QQRSIYPPWT, визначеної SEQ ID NO: 39;
 - 25 (d) HCDR1 амінокислотної послідовності GYSFTGYT, визначеної SEQ ID NO: 40, HCDR2 амінокислотної послідовності INPYNGGT, визначеної SEQ ID NO: 40, HCDR3 амінокислотної послідовності ARDYGYVLDY, визначеної SEQ ID NO: 40, LCDR1 амінокислотної послідовності SSVSY, визначеної SEQ ID NO: 41, LCDR2 амінокислотної послідовності STS, визначеної SEQ ID NO: 41,
 - 30 LCDR3 амінокислотної послідовності QQRSIYPPWT, визначеної SEQ ID NO: 41,
 де антитіло не зв'язується детектованим чином з CLDN9, з'єднаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN9.
2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що не зв'язується детектованим чином з CLDN4, з'єднаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN4, або яке не зв'язується детектованим
- 35 чином з CLDN3, з'єднаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN3.
3. Антитіло за п. 1 або п. 2, яке **відрізняється** тим, що вказана клітина є інтактною клітиною.
4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що воно зв'язується з епітопом, розташованим в позаклітинній частині CLDN6.
5. Антитіло за п. 4, яке **відрізняється** тим, що вказана позаклітинна частина CLDN6 містить
- 40 амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що зв'язування антитіла з CLDN6 включає зв'язування з епітопом, розташованим в межах амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7.

7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке **відрізняється** тим, що CLDN6 має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 або амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що зв'язується з CLDN6, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і яке зв'язується з CLDN6, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8, яке **відрізняється** тим, що має наступну активність:
- (i) знищення клітини, яка експресує CLDN6,
 - (ii) інгібування проліферації клітини, яка експресує CLDN6,
 - (iii) інгібування колонієутворення клітини, яка експресує CLDN6,
 - (iv) опосередкування ремісії розвинутих пухлин,
 - (v) запобігання утворенню або повторному утворенню пухлин, і
 - (vi) інгібування метастазування клітини, яка експресує CLDN6.
10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8, яке **відрізняється** тим, що проявляє імунні ефекторні функції проти клітини, яка несе CLDN6, в нативній конформації.
11. Антитіло за п. 10, яке **відрізняється** тим, що імунні ефекторні функції вибираються із групи, яка складається з комплементзалежної цитотоксичності (CDC), антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (ADCC), індукції апоптозу та інгібування проліферації.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 9-11, яке **відрізняється** тим, що вказана активність або імунна ефекторна функція індукуються зв'язуванням вказаного антитіла з епітопом, розташованим в межах позаклітинної частини CLDN6.
13. Антитіло за п. 12, яке **відрізняється** тим, що вказана позаклітинна частина CLDN6 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6 або SEQ ID NO: 7.
14. Антитіло за будь-яким з пп. 1-13, яке **відрізняється** тим, що вказана клітина, яка експресує CLDN6, або клітина, яка несе CLDN6, в нативній конформації, є пухлинною клітиною.
15. Антитіло за будь-яким з пп. 2-14, яке **відрізняється** тим, що вказана клітина, яка експресує CLDN6, або клітина, яка несе CLDN6, в нативній конформації, є раковою клітиною.
16. Антитіло за п. 15, яке **відрізняється** тим, що ракова клітина належить до раку, вибраного із групи, яка складається з раку яєчника, аденокарциноми яєчника, тератокарциноми яєчника, раку легень, дрібноклітинного раку легень (SCLC), недрібноклітинного раку легень (NSCLC), плоскоклітинного раку легень, аденокарциноми, раку шлунка, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, базальноклітинної карциноми і плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, раку голови і шиї, злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, синовіальної саркоми і карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, перехідно-клітинної карциноми, папілярного раку, раку нирки, нирковоклітинного раку, світлоклітинного раку нирки, папілярну карциному нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, раку клубової кишки, аденокарциноми тонкої кишки і аденокарциноми клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, семіноми яєчка, тератоми яєчка, ембріонального раку яєчка, раку матки, герміноми, тератокарциноми, ембріональної карциноми, ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм.
17. Антитіло за будь-яким з пп. 1-16, яке **відрізняється** тим, що є химерним, людським або гуманізованим антитілом, або фрагментом антитіла.
18. Антитіло за будь-яким з пп. 1-17, яке **відрізняється** тим, що зв'язується з одним або більше епітопами CLDN6 в нативній конформації.
19. Гібридома *Mus Musculus*, депонована під реєстраційним номером DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), або DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A) в DSMZ - Німецькій колекції мікроорганізмів та клітинних культур, де антитіло зв'язується з CLDN6 і не зв'язується з CLDN9, з'єднаним з поверхнею клітини, яка експресує CLDN9.
20. Кон'югат, який містить антитіло за будь-яким з пп. 1-18, сполучене з терапевтичним засобом.
21. Кон'югат за п. 20, який **відрізняється** тим, що терапевтичний засіб є токсином, радіоізотопом, лікарським засобом або цитотоксичним засобом.
22. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-18 або кон'югат за п. 20 або п. 21 і фармацевтично прийнятний носій.
23. Спосіб інгібування росту клітини, яка експресує CLDN6 і характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, який передбачає контакт клітини з антитілом за будь-яким з пп. 1-18 або кон'югатом за п. 20 або п. 21.
24. Спосіб знищення клітини, яка експресує CLDN6 і характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, який передбачає контакт клітини з антитілом за будь-яким з пп. 1-18 або кон'югатом за п. 20 або п. 21.

25. Спосіб лікування або запобігання хворобі або порушенню у суб'єкта, при яких задіяна клітина, яка експресує CLDN6 і характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, який передбачає введення вказаному суб'єктові антитіла за будь-яким з пп. 1-18, кон'югата за п. 20 або п. 21 або фармацевтичної композиції за п. 22.

5 26. Спосіб за п. 25, який **відрізняється** тим, що хвороба або порушення є хворобою, пов'язаною з пухлиною.

27. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що хвороба, пов'язана з пухлиною, є раком.

28. Спосіб за п. 27, який **відрізняється** тим, що рак вибирають з групи, яка складається з раку яєчника, аденокарциноми яєчника і тератокарциноми яєчника, раку легень, дрібноклітинного раку легень (SCLC) і недрібноклітинного раку легень (NSCLC), плоскоклітинного раку легень, аденокарциноми, раку шлунка, раку молочної залози, раку печінки, раку підшлункової залози, раку шкіри, базальноклітинної карциноми, плоскоклітинної карциноми, злоякісної меланоми, раку голови і шиї, злоякісної плеоморфної аденоми, саркоми, синовіальної саркоми, карциносаркоми, раку жовчної протоки, раку сечового міхура, перехідно-клітинної карцином, папілярного раку, раку нирки, нирковоклітинного раку, світлоклітинного раку нирки, папілярної карциноми нирки, раку товстої кишки, раку тонкої кишки, раку клубової кишки, аденокарциноми тонкої кишки і аденокарциноми клубової кишки, ембріональної карциноми яєчка, плацентарної хоріокарциноми, раку шийки матки, раку яєчка, семіноми яєчка, тератоми яєчка і ембріонального раку яєчка, раку матки, герміноми, тератокарциноми, ембріональної карциноми, ембріонально-клітинної пухлини яєчка та їх метастатичних форм.

29. Спосіб інгібування метастатичного поширення клітини, яка експресує CLDN6 і характеризується зв'язуванням CLDN6 з клітинною поверхнею, який передбачає контакт клітини з антитілом за будь-яким з пп. 1-18 або кон'югатом за п. 20 або п. 21.

Позакліткова петля 1

```
CLDN6 (SEQ ID NO: 2) MASAGMOILGVVLTLLGWVNGSLVSCALPMWRVIAFIGNSIVVAQVWVEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN9 (SEQ ID NO: 9) MASTGLELLGHTLAVLGLNLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVWVEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN4 (SEQ ID NO: 10) MASMLQVMETIALAVLGLWGLAVMLCCALPMWRVIAFIGNSIVTSQTIWEGWMNCVVQSTG 60
CLDN3 (SEQ ID NO: 11) -MSMLEITGTALAVLGLNLGTLVCCALPMWRVSAFIGNSIITSONIWEGLWMNCVVQSTG 59
* *::: * .*:****: ::.****:*:*:****:.,*:.: * ;*****.*****
```

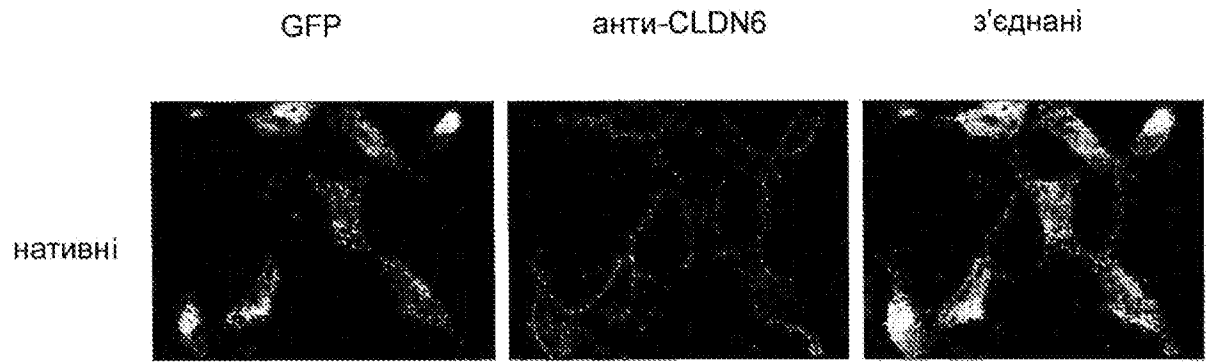
```
CLDN6 (SEQ ID NO: 2) QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARIVLT 120
CLDN9 (SEQ ID NO: 9) QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARIVLT 120
CLDN4 (SEQ ID NO: 10) QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALVVISIIVAAIGVLLSVVGGKCTNCLEDESAAKATMIV 120
CLDN3 (SEQ ID NO: 11) QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALIVVAILLAAFGLLVALVSAQCTNCVQDOTAKAKITIV 119
*****:::****: *::: * .*:****: .:****: *::: * .*:****: .:****: * .:****: *
```

Позакліткова петля 2

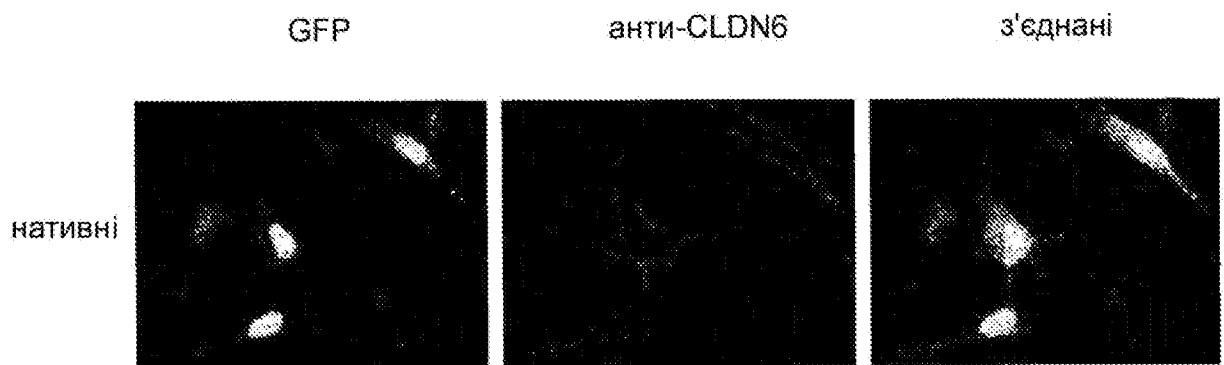
```
CLDN6 (SEQ ID NO: 2) SGIVFVYISGVLTLPVPCWTAHAIIRDFYNFLVAEQKRELGSALYLGMWAAAGLLLLGGGL 180
CLDN9 (SEQ ID NO: 9) AGVILLLAGILVLPVPCWTAHAIIRDFYNFLVAEQKRELGSALYLGMWAAAGLLLLGGGL 180
CLDN4 (SEQ ID NO: 10) AGVVFLLAGLMVIVPVSWTAHAIIRDFYNFLVASEQKREMGASLYVGMWAAAGLLLLGGGL 180
CLDN3 (SEQ ID NO: 11) AGVFLLAALLTLVPVSWSANTIIIRDFYNFVFEAQKREMGAGLYVGMWAAAGLLLLGGGL 179
:::****: *::: * .*:****: .:****: *::: * .*:****: .:****: * .:****: *
```

```
CLDN6 (SEQ ID NO: 2) LCCTCFSGSSQGFSHYMARYSTSAPAIISRGFSEYP-----TKNYV 220
CLDN9 (SEQ ID NO: 9) LCCTCFPPQVERPRG--PRLGYSIPSRG-GASGLD-----KRDYV 217
CLDN4 (SEQ ID NO: 10) LCCNCFPRY---DKPYSAK---YSAARSAASN-----YV 209
CLDN3 (SEQ ID NO: 11) LCCSEPPR---EKKYTATKVVSAPRSTGPCASLGTCYDRDYV 220
***, **, ., * .:****: .:****: *
```

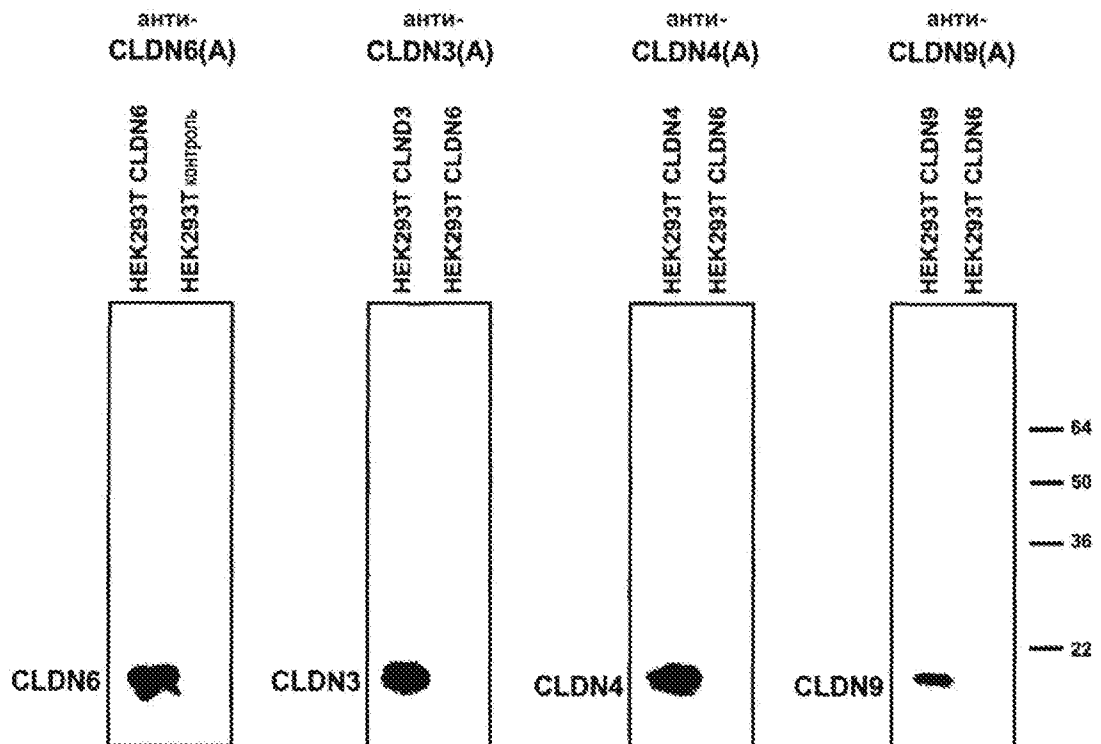
Фіг. 1



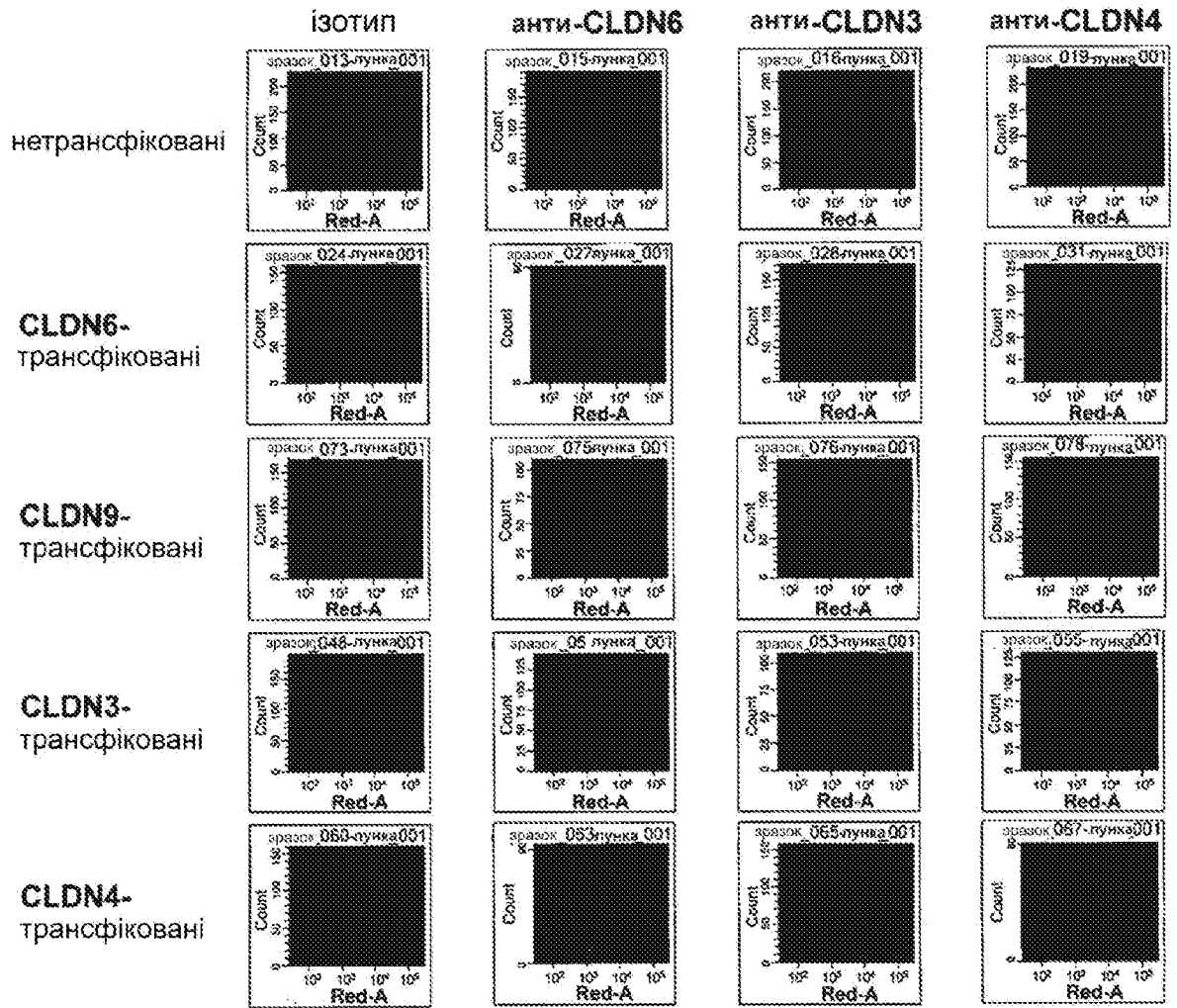
Фіг. 2А



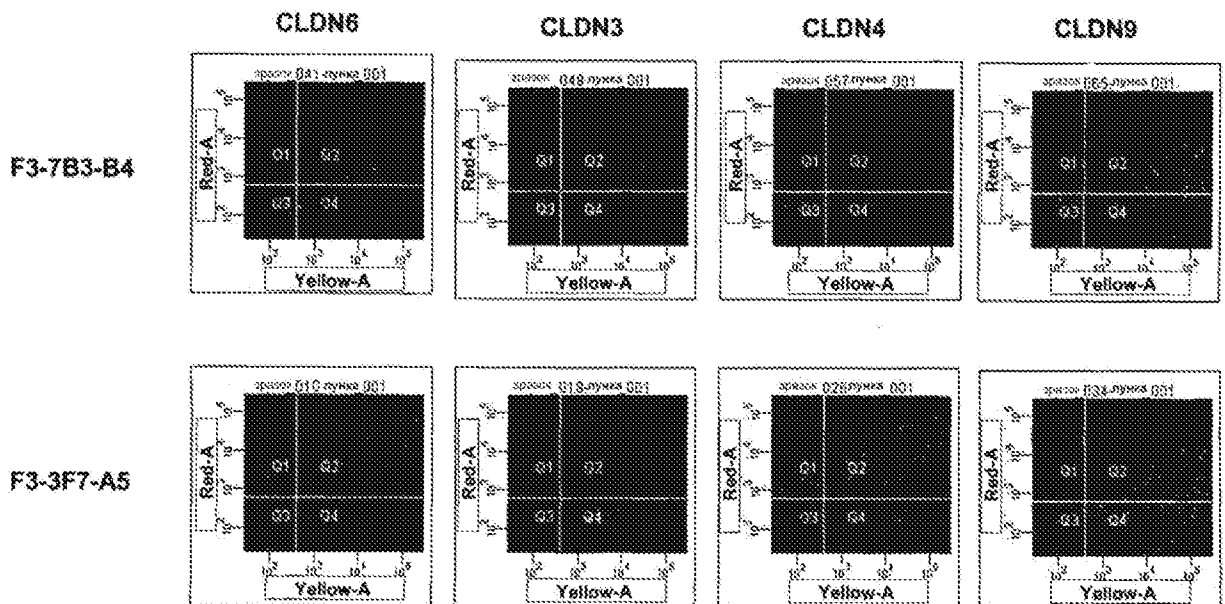
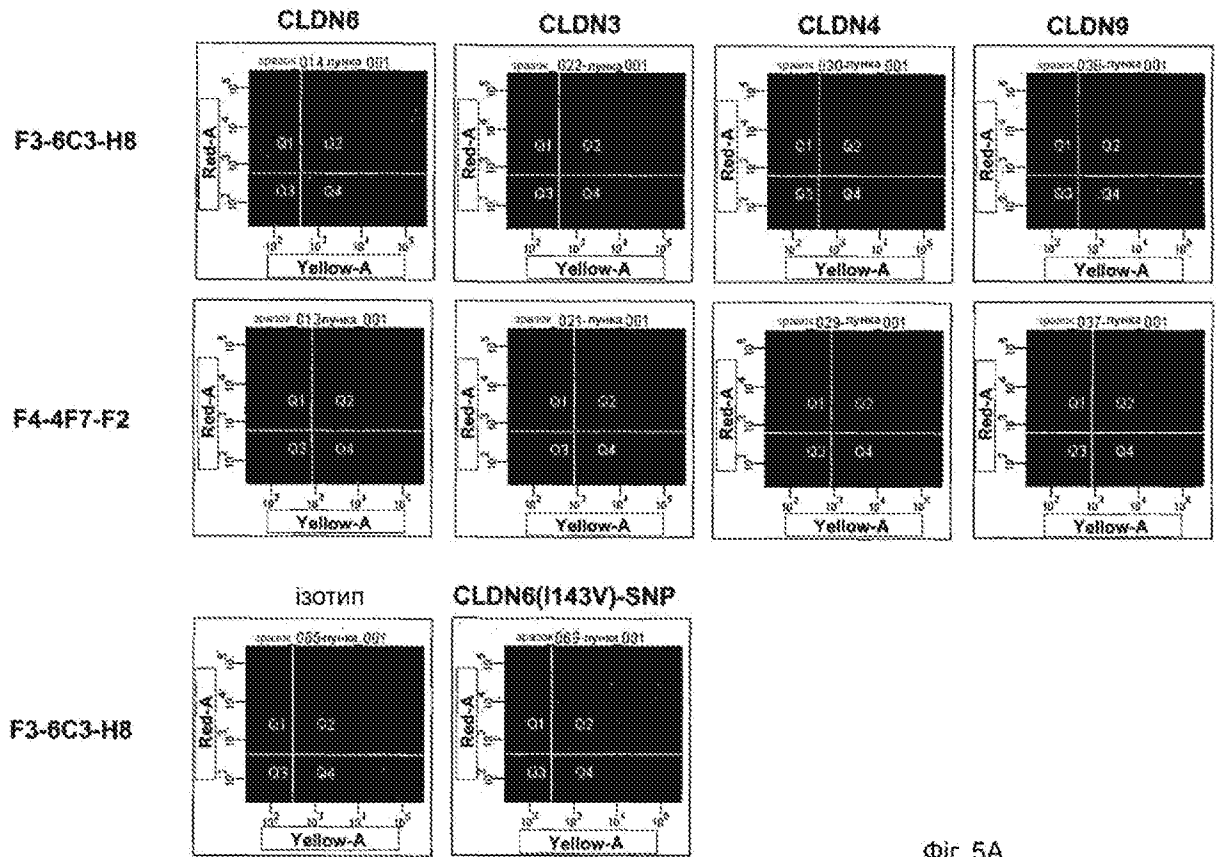
Фіг. 2В



Фіг. 3



Фіг. 4



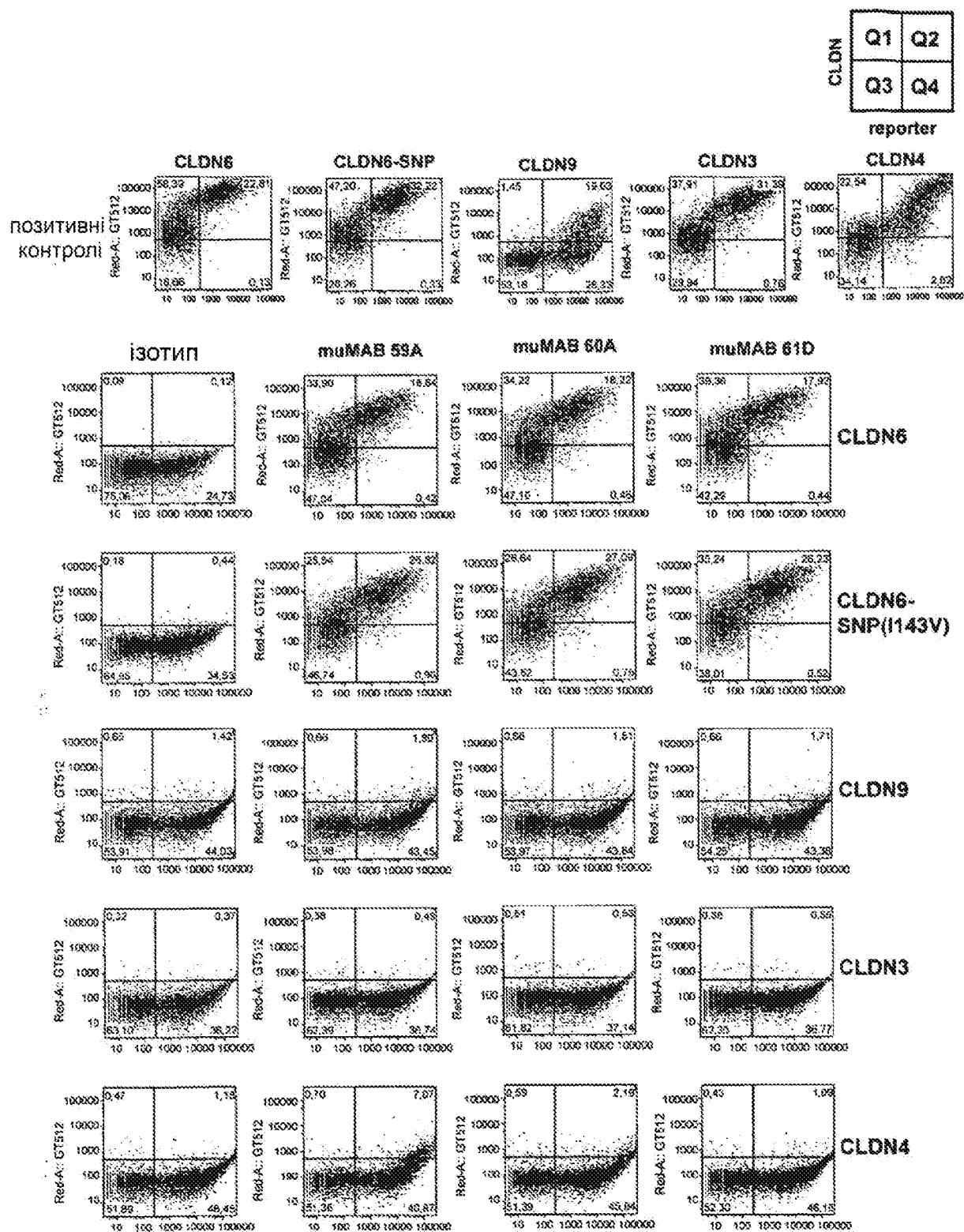
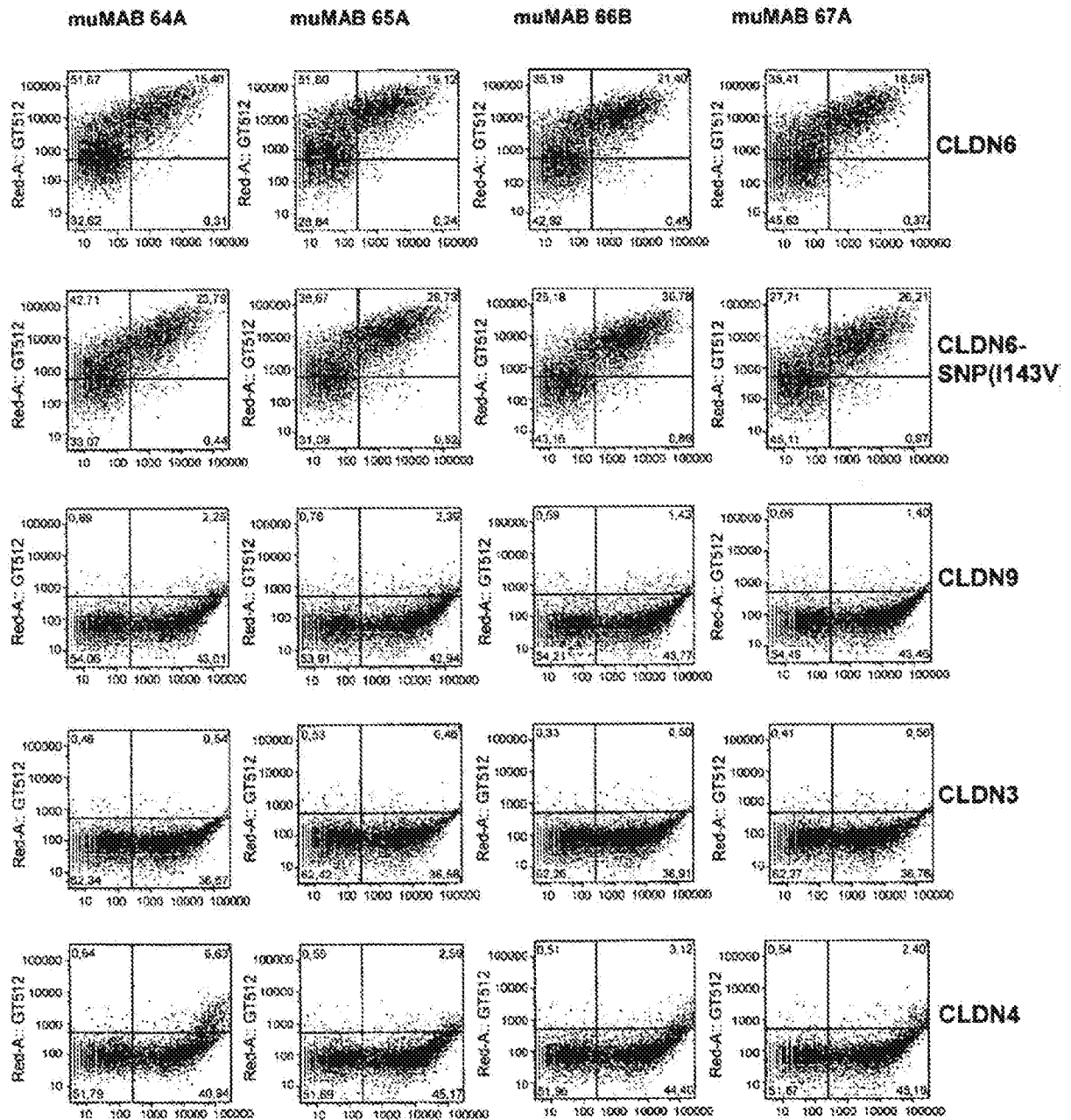
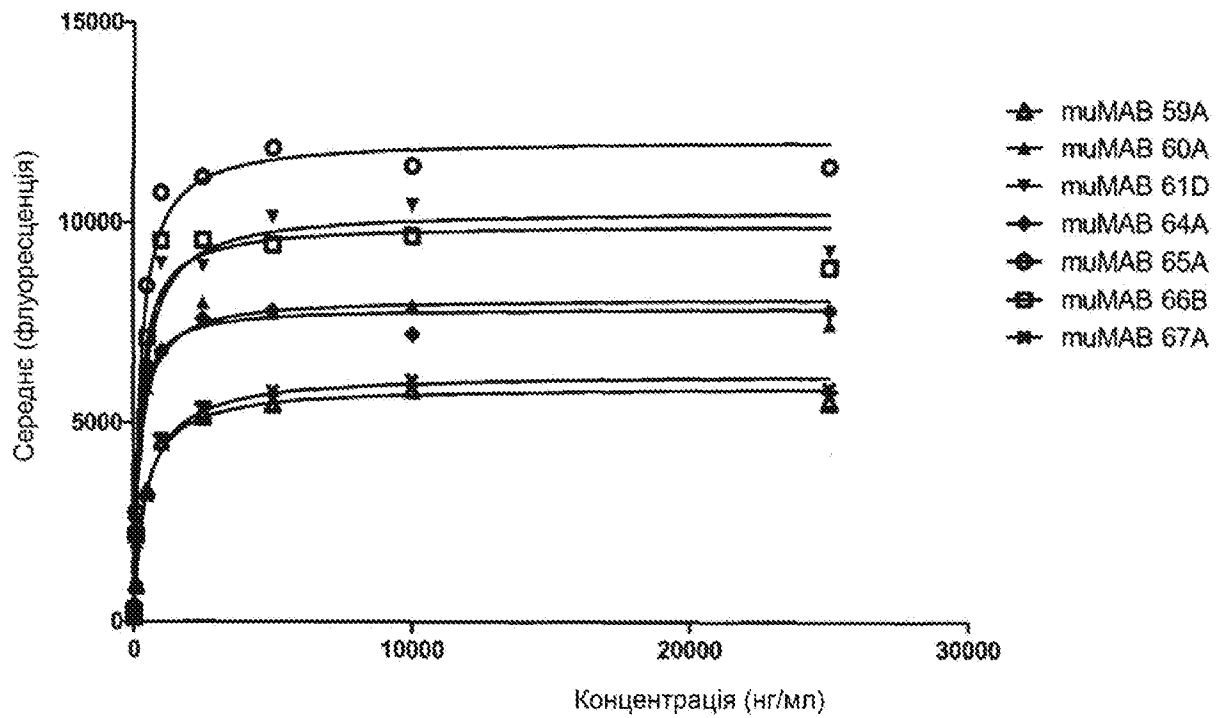


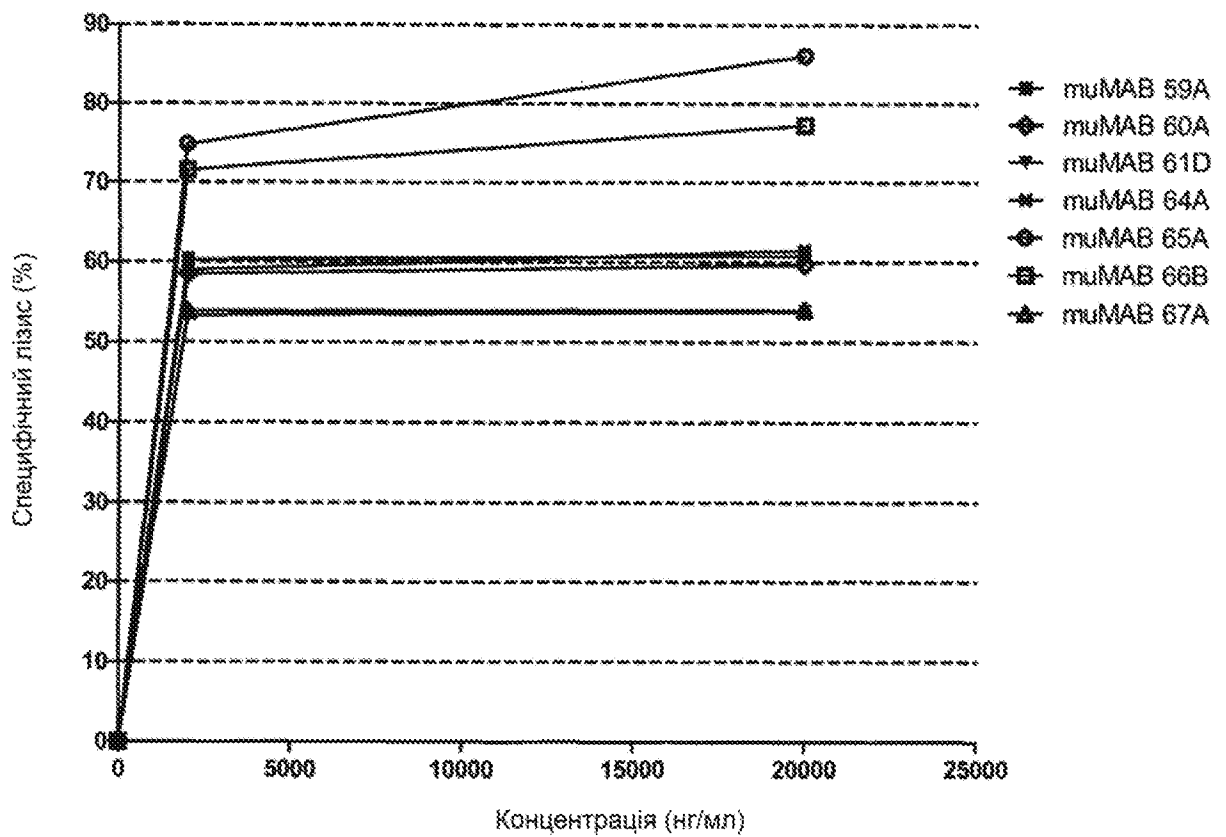
Fig. 6



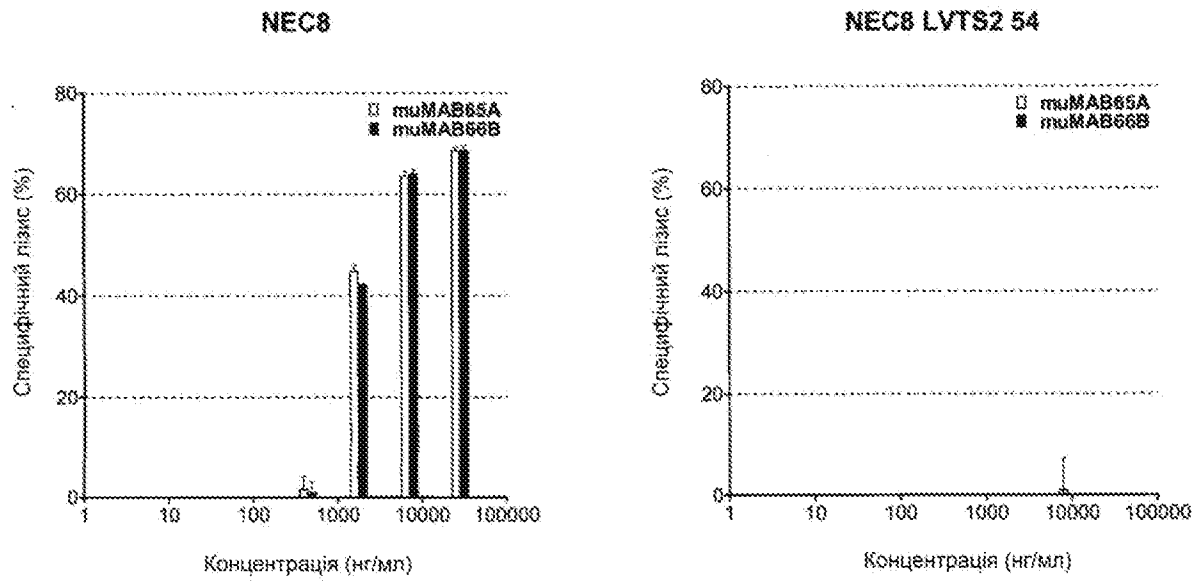
Фіг. 6 (контр)



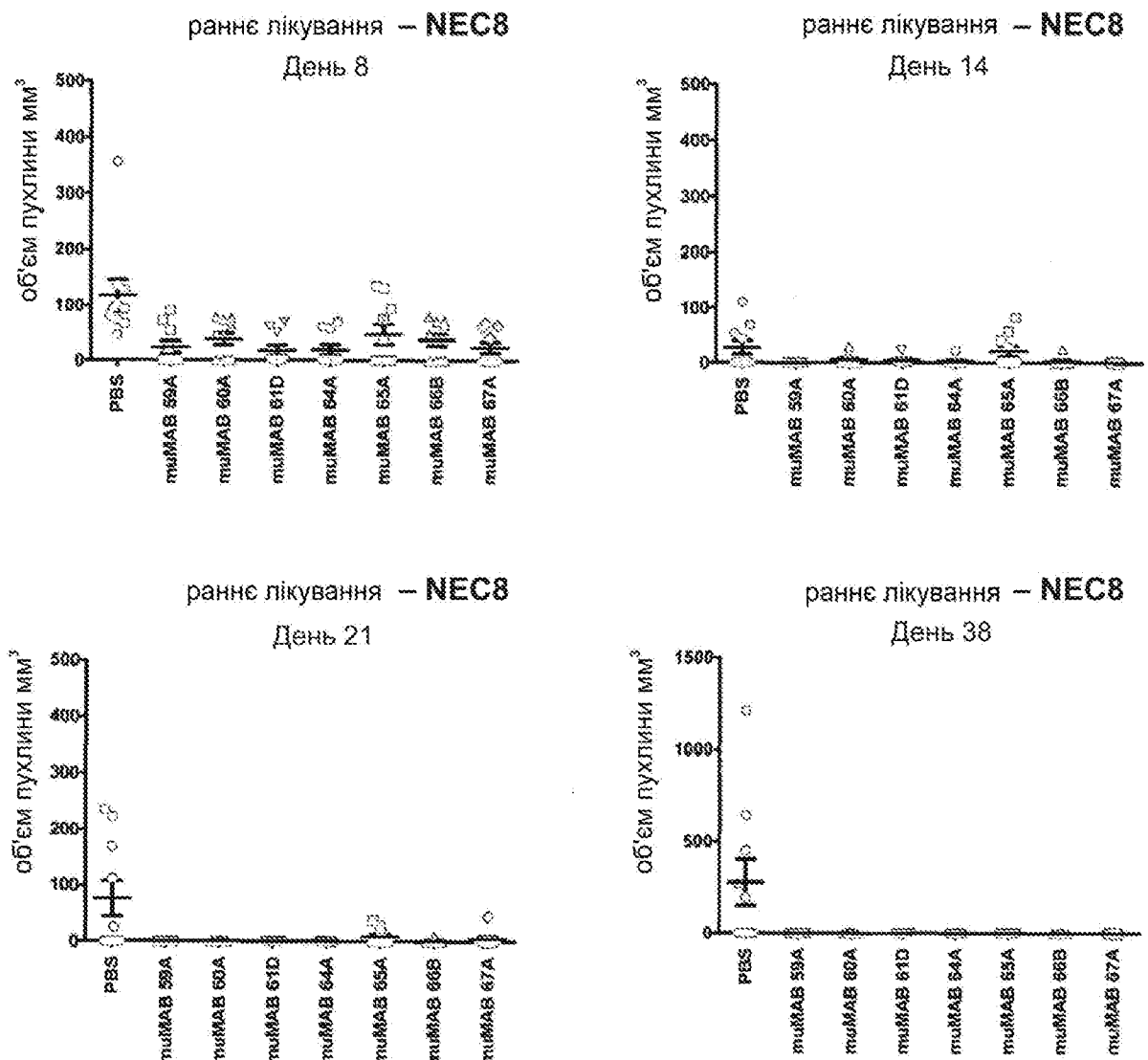
Фіг. 7



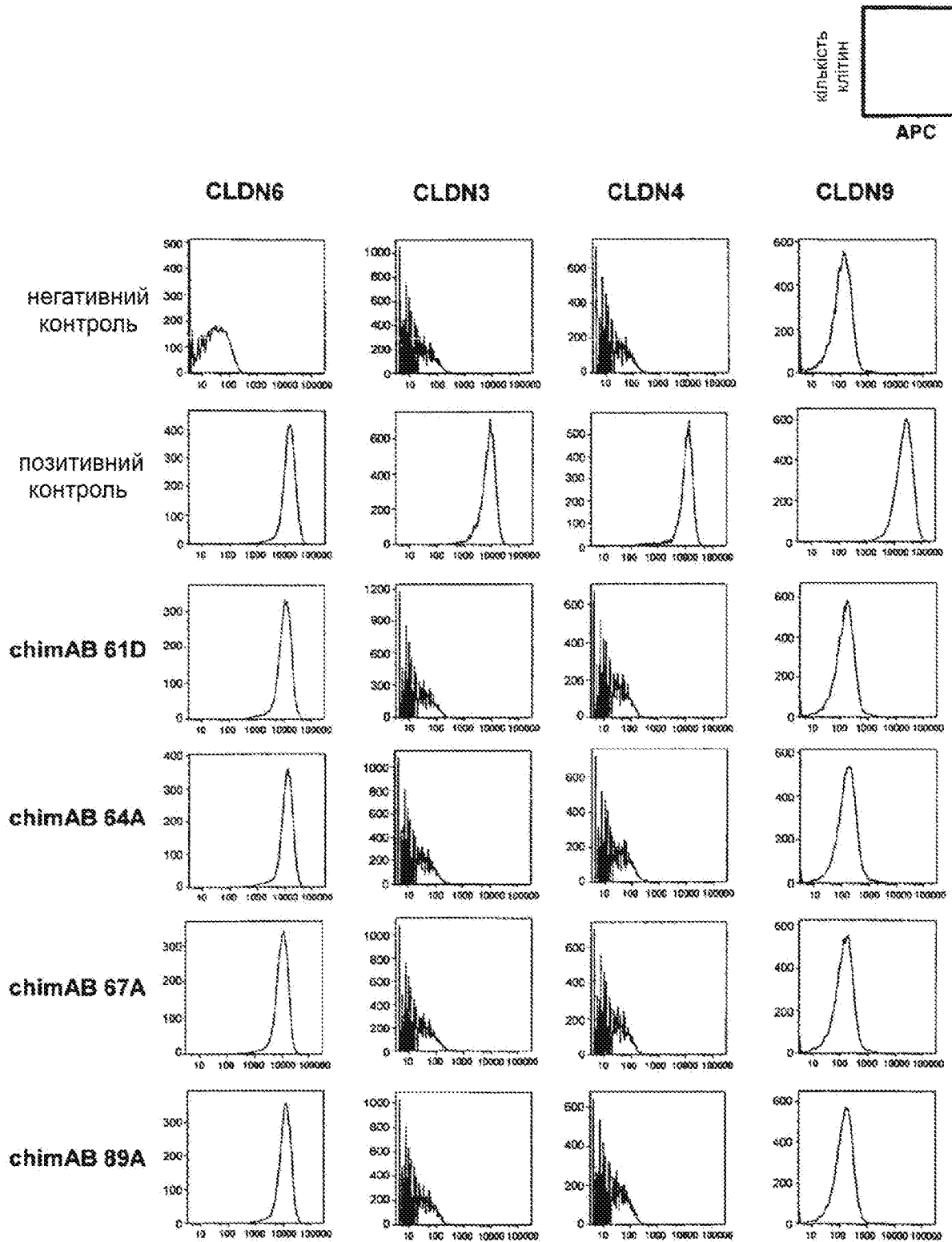
Фіг. 8



Фіг. 9

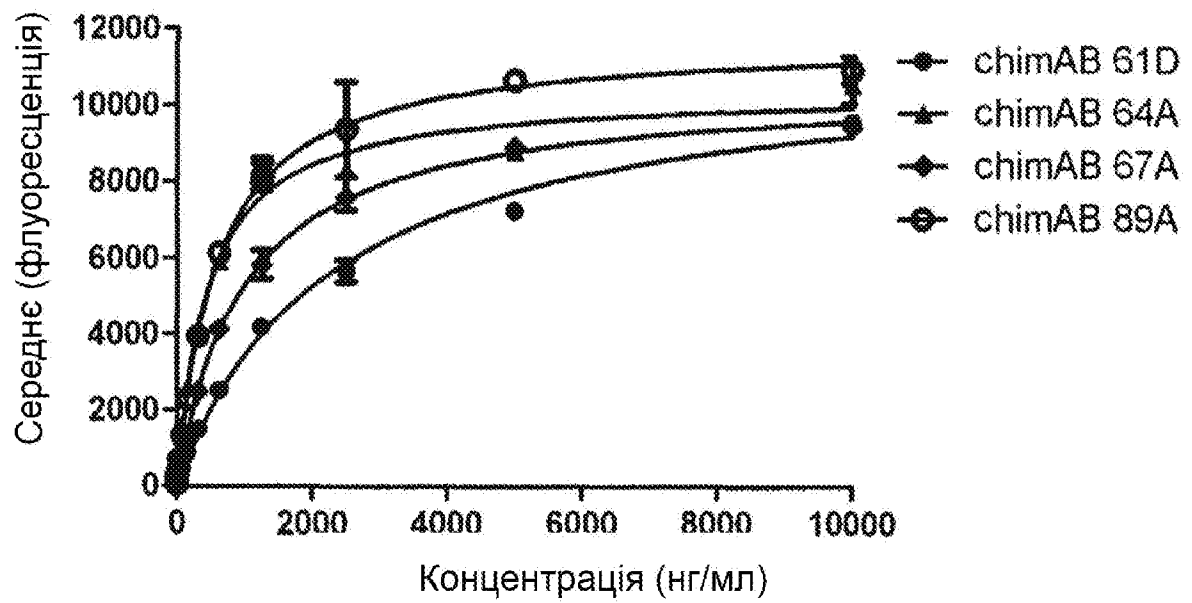


Фіг. 10



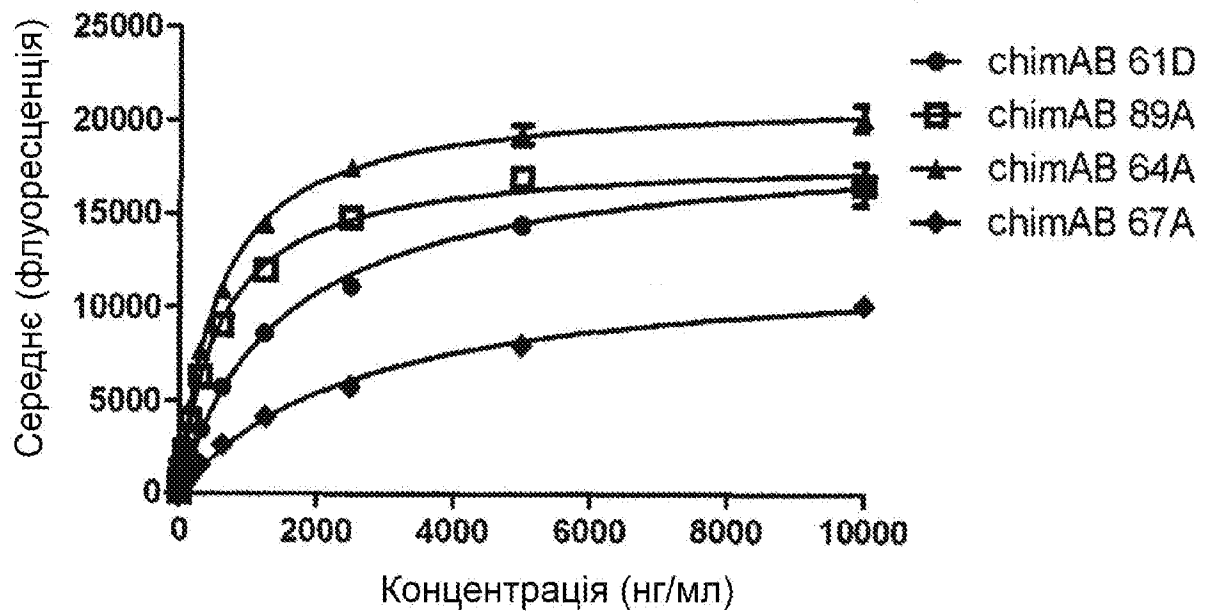
Фіг. 11

Зв'язування з HEK293-CLDN6

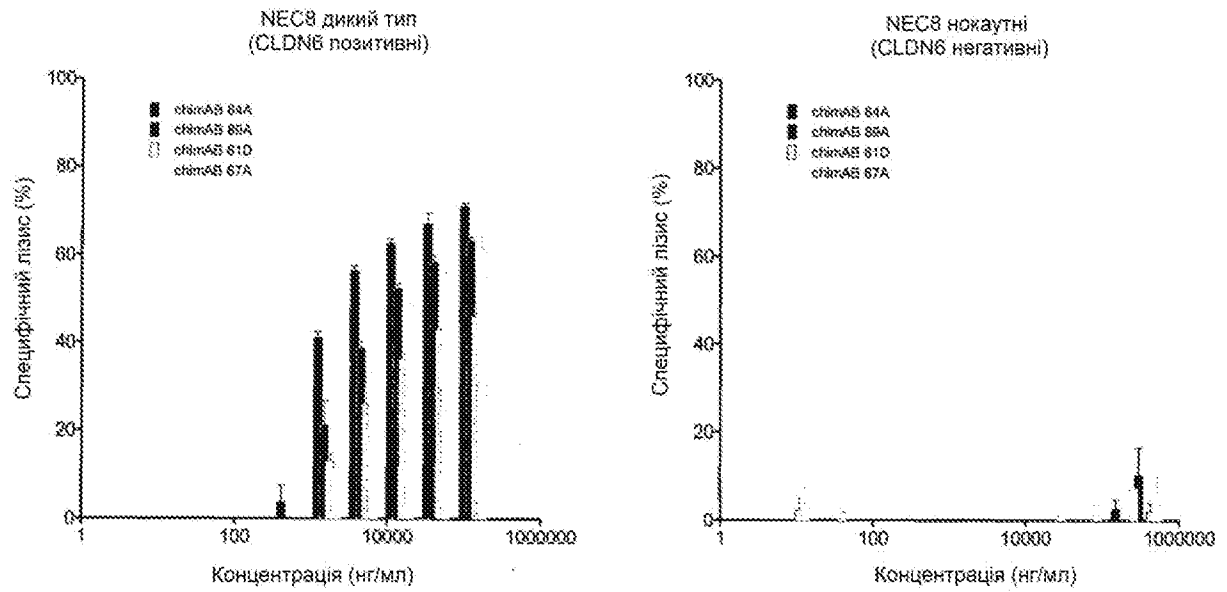


Фіг. 12

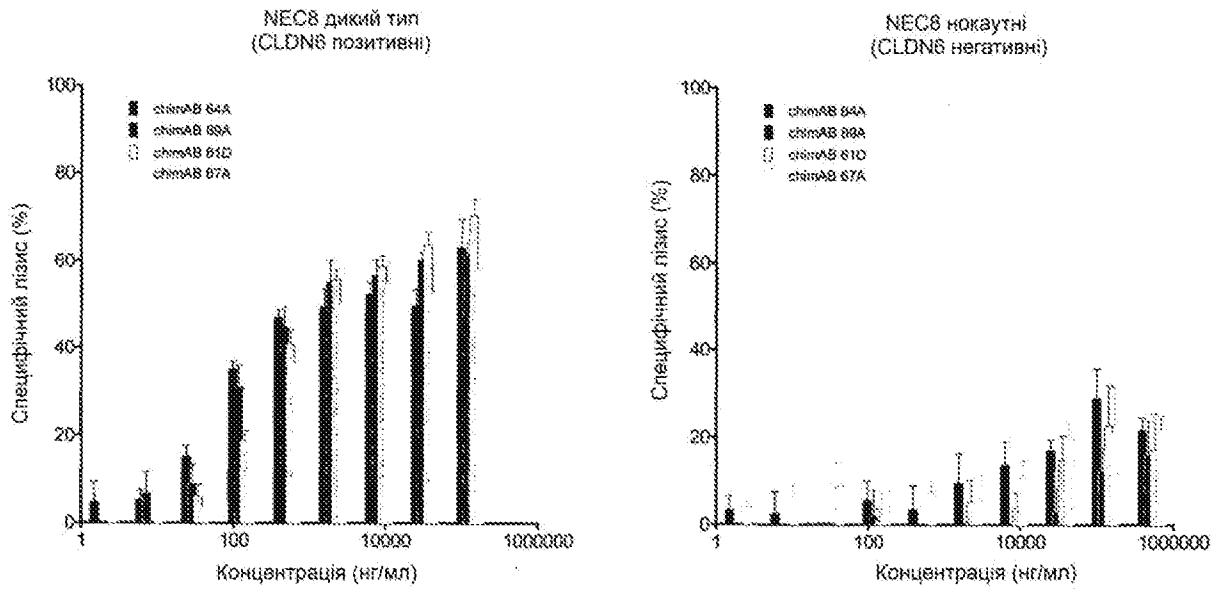
Зв'язування з Ov90



Фіг. 14



Фіг. 15



Фіг. 16

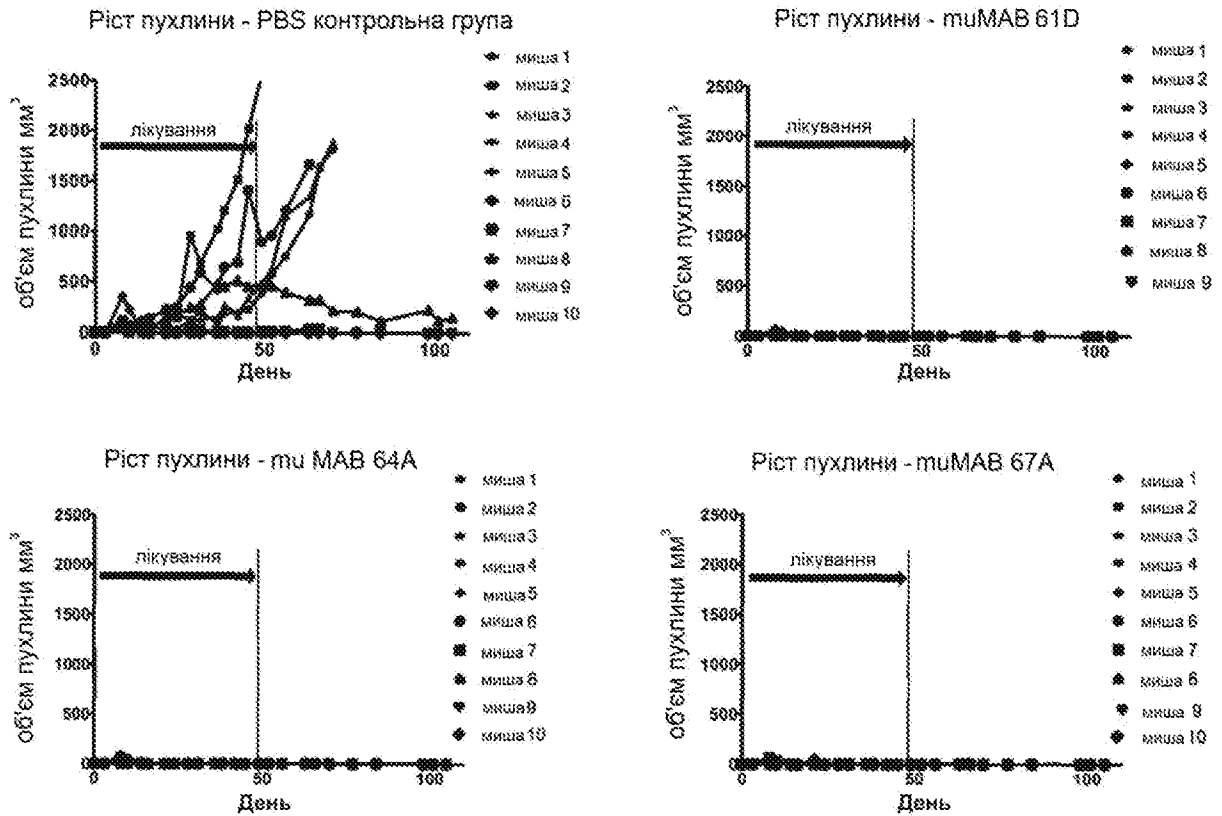


Fig. 17

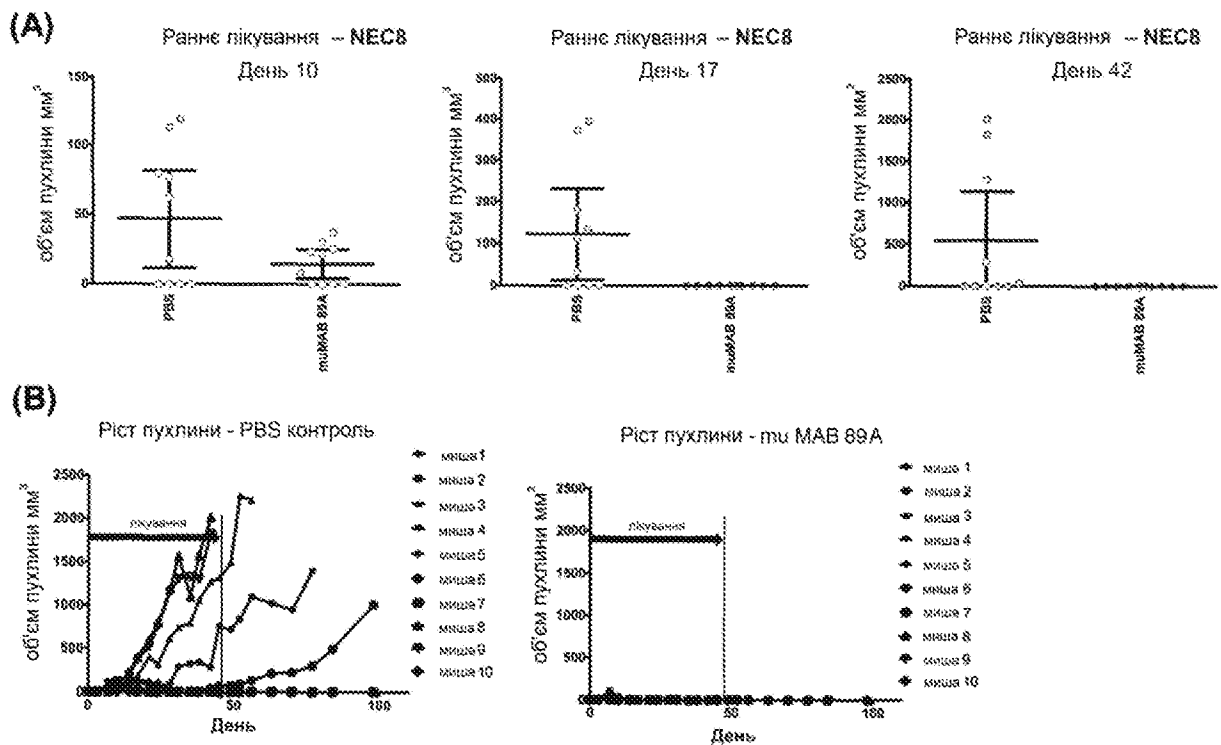
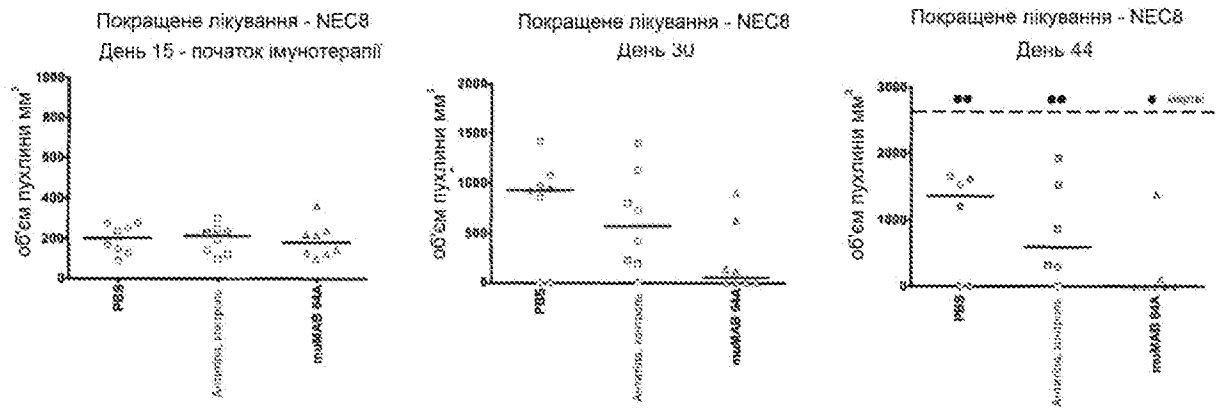
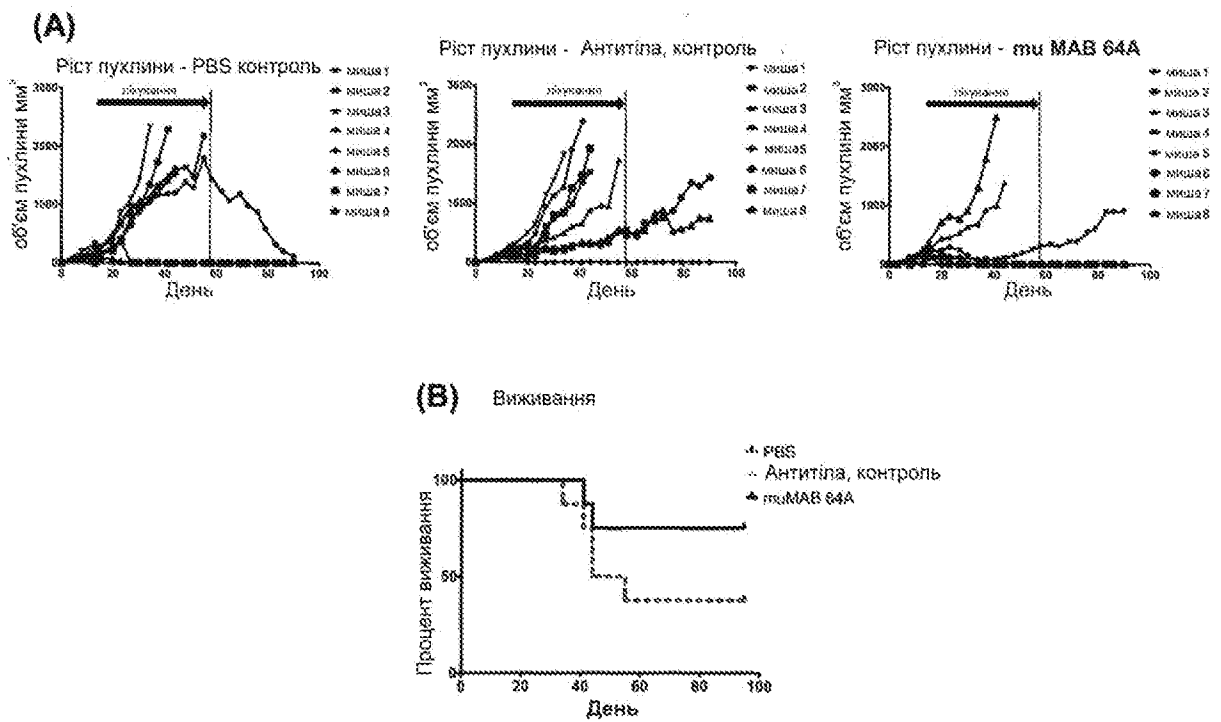


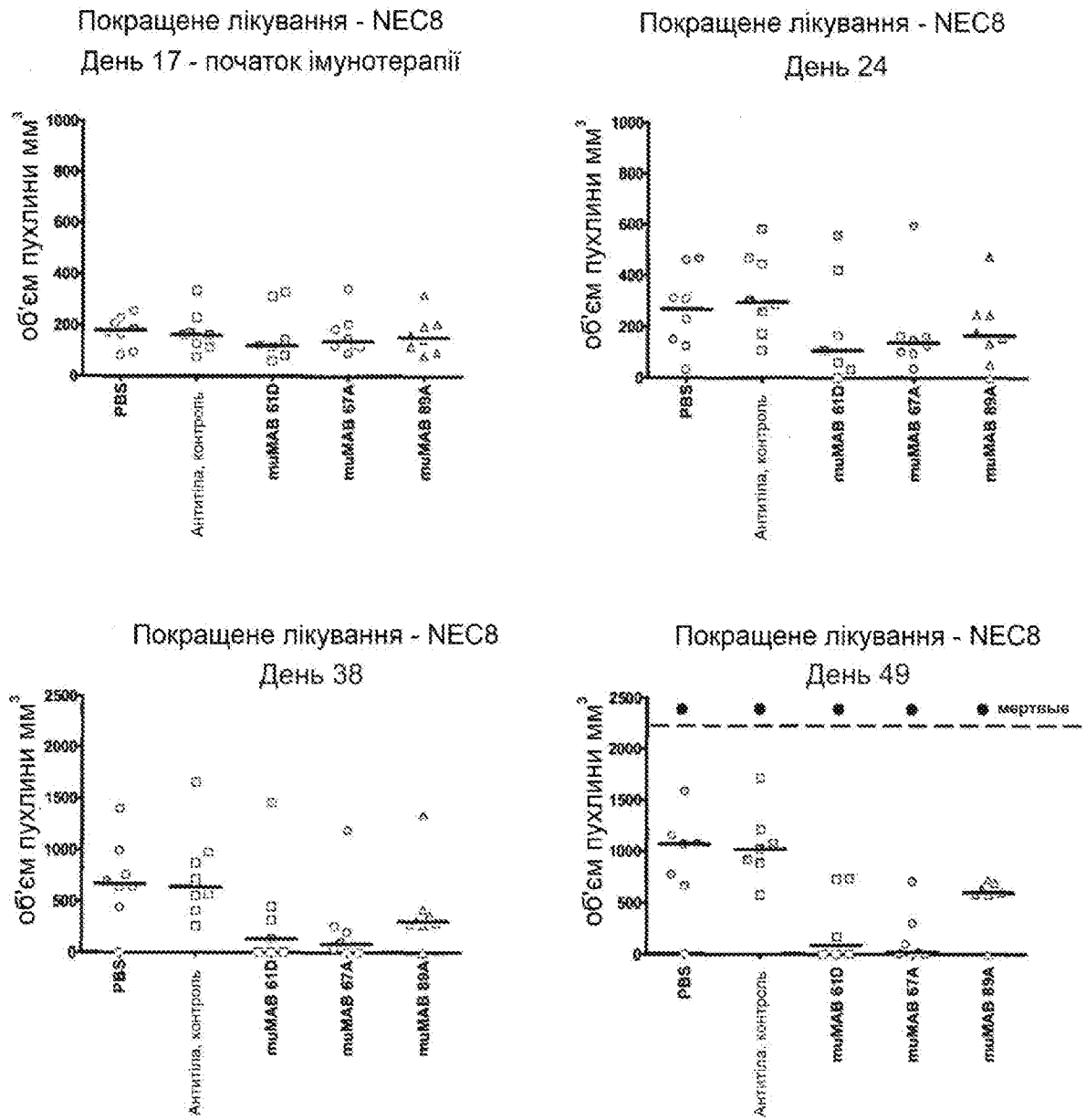
Fig. 18



Фіг. 19

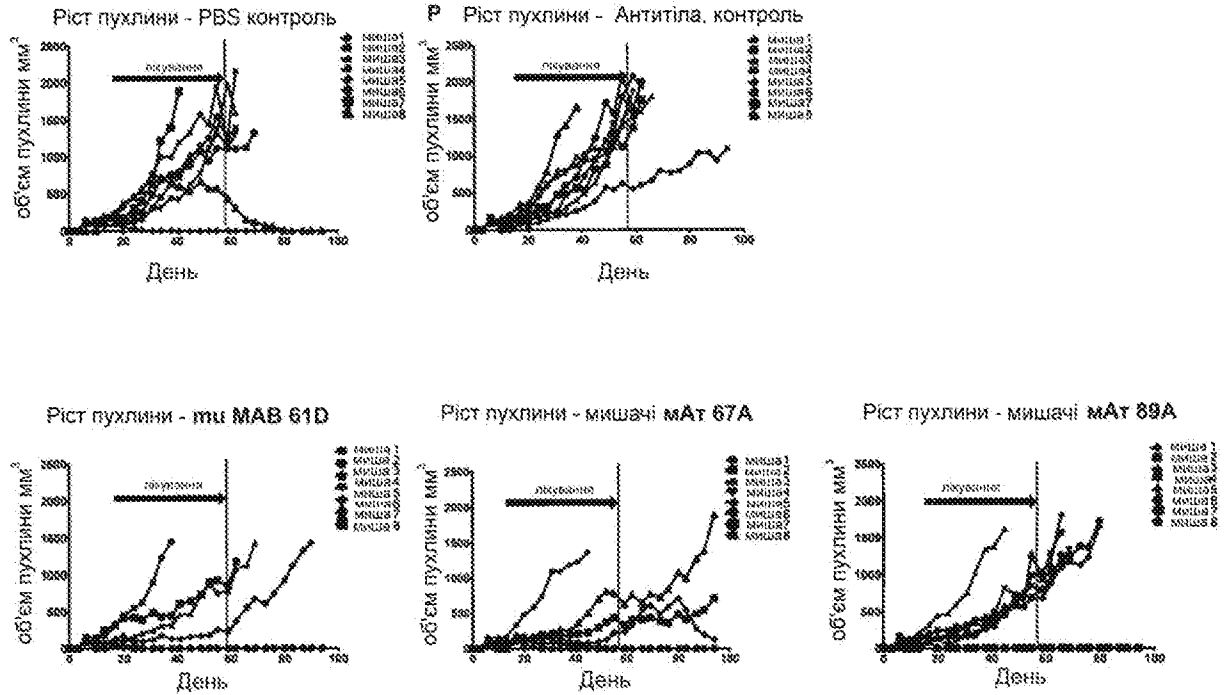


Фіг. 20

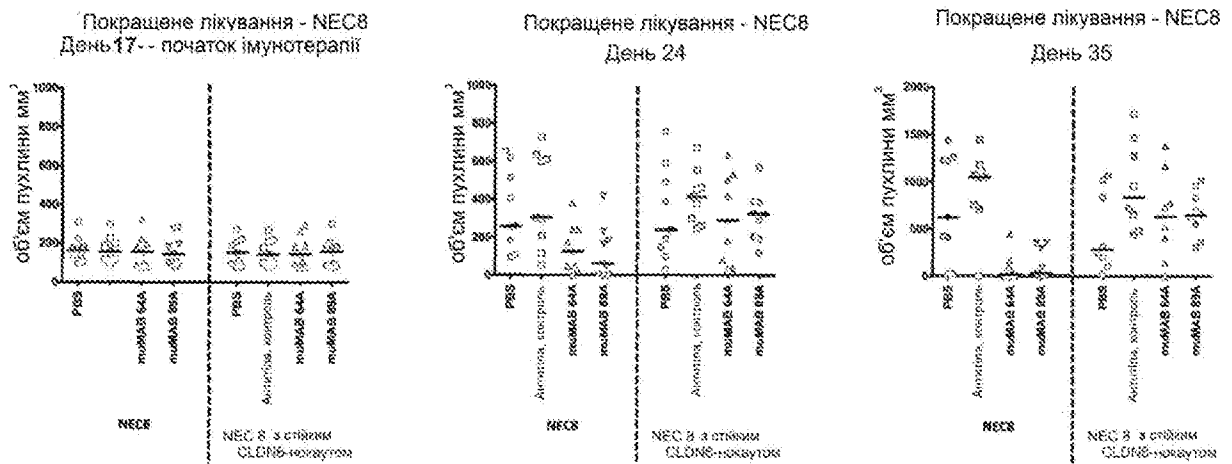


Фіг. 21

(A)



Фіг. 22



Фіг. 23

[illegible]

☒	змінений транспорт до мембрани
☐	немає впливу на зв'язування антитіла
☐	сприяє зв'язуванню антитіла
☒	суттєво для зв'язування антитіла

Φir. 24

HCDR1											HCDR2											Section 1
SEQ ID NO:	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80												
34	H61D	(1)	EVQLQQSGP	ELVKPGAS	MRTISCKAS	SYSTFGYT	MHWVQSGHG	NLEWIGLI	NPYNGGT	SYNQKPKGR	ATLTIDKSS	STAYNELL	SLT	TS								
36	H64A	(1)	EVQLQQSGP	ELVKPGAS	MRTISCKAS	SYSTFGYT	MHWVQSGHG	NLEWIGLI	NPYNGGT	SYNQKPKGR	ATLTIDKSS	STAYNELL	SLT	TS								
38	H67A	(1)	EVQLQQSGP	ELVKPGAS	MRTISCKAS	SYSTFGYT	MHWVQSGHG	NLEWIGLI	NPYNGGT	SYNQKPKGR	ATLTIDKSS	STAYNELL	SLT	TS								
40	H89A	(1)	EVQLQQSGP	ELVKPGAS	MRTISCKAS	SYSTFGYT	MHWVQSGHG	NLEWIGLI	NPYNGGT	SYNQKPKGR	ATLTIDKSS	STAYNELL	SLT	TS								
Consensus		(1)	EVQLQQSGP	ELVKPGAS	MRTISCKAS	SYSTFGYT	MHWVQSGHG	NLEWIGLI	NPYNGGT	SYNQKPKGR	ATLTIDKSS	STAYNELL	SLT	TS								
HCDR3											Section 2											
		(90)	80	100	117																	
	H61D	(90)	DSAVYYC	ARDYG	YVLDY	WGQGITL	TVSS															
	H64A	(90)	DSAVYYC	ARDYG	YVLDY	WGQGITL	TVSS															
	H67A	(90)	DSAVYYC	ARDYG	YVLDY	WGQGITL	TVSS															
	H89A	(90)	DSAVYYC	ARDYG	YVLDY	WGQGITL	TVSS															
Consensus		(90)	DSAVYYC	ARDYG	YVLDY	WGQGITL	TVSS															

Fig. 25

Diagram illustrating the structure of the L67A protein, showing domains LCDR1, LCDR2, and LCDR3. The protein is represented as a horizontal bar with residue numbers 1 to 98. The sequence is shown below the bar, with the consensus sequence at the bottom.

Sequence alignment (Residues 1-98):

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      70      80      98
35 L61D (1) QIVLTQSPAIMSASGPERVYITCSASGVSYLNHFQQRPGTSPKLWVETSLNPSGVPARFSGSGSGTSYSLTIISRVAAEDAATYYCQQ
39 L67A (1) QIVLTQSPAIMSASGPKVYITCSASGVSYLNHFQQRPGTSPKLWVETSLNPSGVPARFSGSGSGTSYSLTIISRVAAEDAATYYCQQ
37 L64A (1) QIVLTQSPAIMSASGPERVYITCSASGVSYLNHFQQRPGTSPKLWVETSLNPSGVPARFSGSGSGTSYSLTIISRVAAEDAATYYCQQ
41 L89A (1) QIVLTQSPAIMSASGPERVYITCSASGVSYLNHFQQLNPGTSPKLLVETSLNPSGVPARFSGSGSGTSYSLTIISRVAAEDAATYYCQQ
Consensus (1) QIVLTQSPAIMSASGPERVYITCSASGVSYLNHFQQRPGTSPKLWVETSLNPSGVPARFSGSGSGTSYSLTIISRVAAEDAATYYCQQ

```

Diagram illustrating the structure of the L67A protein, showing domains LCDR1, LCDR2, and LCDR3. The protein is represented as a horizontal bar with residue numbers 1 to 98. The sequence is shown below the bar, with the consensus sequence at the bottom.

Sequence alignment (Residues 90-107):

```

(90) 90      107
L61D (90) RSIYFPNWTEGGGCKLEIK
L67A (90) RSIYFPNWTEGGGCKLEIK
L64A (90) RSNYPFWTEGGGCKLEIK
L89A (90) RNNYPFWTEGGGCKLEIK
Consensus (90) RSNYPFWTEGGGCKLEIK

```

Fig. 26

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601